

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Genética**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudios citogenéticos en Beta vulgaris L.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Luis Cistué Sola**

**Madrid, 2015**

7P  
1070  
218

Luis Cistué Sola



\* 5 3 0 9 8 6 7 3 5 7 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-042-1984

ESTUDIOS CITOGENETICOS EN BETA VULGARIS L.

Departamento de Genética  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1984

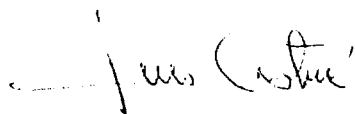


BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 213/84

© Luis Cistué Sola  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-20415-1984

AUTOR : Luis Cistué Solá



TITULO : Estudios citogenéticos en Beta vulgaris L.

DIRECTOR : Jose Manuel Lasa Dolhageray

Dr. Ing<sup>a</sup>. Agrónomo

Investigador del C.S.I.C.

Universidad Complutense de Madrid.

Facultad de Ciencias.

Sección de Biológicas.

1.983



# INDICE

## págs.

Agradecimientos .....	III
I .- INTRODUCCION .....	1
1. Cariotipos de Beta vulgaris L. ....	2
2. Trisómicos primarios .....	3
3. Trisómicos primarios en remolacha .....	6
4. Utilización de trisómicos primarios .....	8
5. Paquitenas .....	11
6. Cariotipos paquiténicos en el genero Beta .....	14
7. Longitud del cromosoma durante la mitosis .....	15
8. Cromómeros y heterocromatina .....	17
9. Problemas de medidas en cariotipos .....	20
II .- OBJETIVOS .....	23
III.- MATERIAL Y METODOS .....	24
1. Material Vegetal .....	24
2. Métodos .....	26
IV .- RESULTADOS .....	30
1. Cariotipo metafásico en diploides .....	30
2. Haploides. ....	35
3. Cariotipo prometáfásico en diploides .....	59
4. Cariotipo profásico .....	67
5. Comparaciones entre metafases, prometafases y profases ..	82
6. Estudio de la contracción del cromosoma .....	85
7. Identificación positiva de la serie trisómica .....	115
8. Identificación de un acrotrisómico 9 .....	157
V .- DISCUSION .....	164
1. Cariotipo metafásico en diploides .....	164
2. Haploides .....	166
3. Cariotipo prometáfásico en diploides .....	168

	<u>págs.</u>
4. Cariotipo profásico .....	169
5. Evolución del cromosoma desde profase a metafase .....	176
6. Estudio de la contracción del cromosoma .....	179
7. Identificación positiva de la serie trisómica .....	183
8. Identificación de un acrotrisómico 9 .....	185
VI .- CONCLUSIONES .....	186
VII.- REFERENCIAS .....	188

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. D. José Manuel Lasa Dolhagaray, por el planteamiento y guía en la realización de este trabajo. Su contribución a mi formación, como profesor y amigo, es también fuertemente apreciada.

También quiero agradecer a mis compañeros del departamento de Genética y Producción Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, P. Gracia, B. Medina, J.M. Sanz, C. Pérez Peña, M.J. Espiau, C. Gracia, P. Asin y en especial al doctor I. Romagosa por su constante ayuda y consejo.

Así mismo agradezco a los Profesores Dr. E. Sanchez Monge y Parellada y Dr. J.I. Cubero Salmerón que tuvieron la atención de revisar el texto, su asesoramiento y consejo. Muy especialmente quiero agradecer al Profesor Dr. J.R. Lacadena Calero por las correcciones realizadas en el presente trabajo, así como por su amabilidad y ayuda en todo momento.

Este estudio ha sido financiado por el Comité Conjunto Hispano-Norteamericano para la Cooperación Científica y Técnica, bajo el proyecto de Investigación Cooperativa III P 3040.





## I. INTRODUCCION

La remolacha (*Beta vulgaris* L.) es una planta de gran importancia económica en todo el mundo; un pequeño ejemplo nos lo ofrece el hecho, de que el valor bruto de la raíz cosechada en un año promedio en nuestro país, podría estimarse en pesetas actuales en unos 60 mil millones, a lo que hay que sumar los valores añadidos de fabricación, subproductos, etc... con lo que nos encontramos, en cifras de movimiento de unos 80 mil millones de pesetas anuales, a partir de únicamente 200 mil Ha. lo que demuestra su calificación de cultivo de alta rentabilidad y tremendo impacto social.

A pesar de ello, ha sido muy poco estudiada en su aspecto citogenético, si bien desde el punto de vista agronómico hay abundancia de bibliografía. Sin embargo en los últimos años, los estudios citogenéticos sobre esta planta han sufrido un aumento considerable y así vemos que Nakamura (1979) presenta un cariotipo paquiténico, Skaracis (1980) un detallado estudio de la meiosis en remolachas diploides, Yu (1980) en monoploides y Romagosa (1980) sobre triploides.

Los últimos avances en manipulación cromosómica y más fundamentalmente en ingeniería genética, y sobre todo, lo que de esta última técnica puede esperarse en un próximo futuro, nos indica la clara necesidad de adquirir los conocimientos genéticos básicos sobre la especie, para que de esta forma, las citotécnicas puedan algún día ser utilizadas en la misma. Una primera aproximación a estos conocimientos sería el intento de adscribir los diversos caracteres de importancia a los nueve teóricos grupos de ligamiento.

A la vista de esta problemática pasaremos una revisión sobre el estado actual de conocimientos en los distintos aspectos citogenéticos de la remolacha ucarera, así como de técnicas citológicas y manejo de aneuploides.

### 1. Cariotipos de Beta vulgaris L.

El complemento de la especie presenta dos problemas para su identificación. Por un lado, su reducido tamaño que ronda las  $2,5 \mu$  como media. Por otro, el que todos los cromosomas son muy parecidos en tamaño y posición centromérica. La suma de los dos, ha llevado al fracaso todos los intentos de identificación positiva de los nueve cromosomas de que consta esta planta.

Kakhidze (1935) y Sirotina (1936) publicaron los primeros trabajos. Zaikovskaja (1938) realizó el primer cariotipo, pero fue Savitsky y Charecko-Savichkaja (1940) quien presentó el primer estudio detallado. Con posterioridad Adati y Mistuishi (1962) mostraron un trabajo sobre diversas especies del género Beta sin medir los cromosomas, mientras que Ando y Takahashi (1969) los midieron aunque dando sólo la longitud cromosómica media y las longitudes de los cromosomas más largo y más corto. Bosemark y Bormotov (1971) hicieron el único cariotipo utilizado hasta el momento, a partir de una línea homocigótica. La longitud cromosómica media es  $2,46 \mu$  con una diferencia de más-menos  $0,45 \mu$ . A partir de las medidas de  $r$  proponen que hay siete cromosomas de posición centromérica media puesto que sólo dos rebasan el dato de 1,67 para  $r$ , dado por Levan et al. (1964) para que un cromosoma pueda ser considerado submetacéntrico. Opinan que se debe intentar encontrar alguna técnica de bandeo puesto que por los métodos tradicionales sólo distinguen el cromosoma del satélite.

A partir de haploides de Jong y de Bock (1978) ponen a punto una técnica para bandas C, pero no tiene utilidad identificadora. Según longitud e índice centromérico dicen poder distinguir los cromosomas 1, 8 y 9. Hablan también de la posibilidad de utilizar cromómeros profásicos como método diferenciador aunque lo consideran un método imposible. Chugunkova, et al (1979) publican un trabajo parecido utilizando también tinción diferencial.

Tsuchiya y Nakamura (1979) presentaron un interesante método de tinción

aplicable también al género Beta, aunque no entraron a tratar el cariotipo. Hay que tener en cuenta que utilizan tratamientos de frío de 8 a 24 horas, que se muestran excesivos para estos cromosomas.

Cistué (1979) realiza estudios sobre los índices mitóticos de las raíces de remolacha, reacción a tratamientos de frío y calor, y como consecuencia de ello acumulación de placas profásicas y metafásicas.

## 2. Trisómicos primarios

Desde el descubrimiento del trisómico "Globe" de Datura en 1915, (Avery, 1959), se ha publicado una gran cantidad de literatura referida a trisómicos. Al principio eran de origen espontáneo en poblaciones naturales, pero sus frecuencias de aparición eran tan bajas que se hacía necesario muestrear grandes poblaciones para encontrar unos pocos.

Posteriormente se utilizaron agentes químicos y físicos para la producción artificial de trisómicos. Más tarde se comprobó que se podían obtener números elevados mediante cruzamientos con plantas poliploides.

Para cualquier estudio sobre morfología de trisómicos primarios, citología, asociaciones o configuraciones cromosómicas, transmisión del extra cromosoma etc. es recomendable consultar a Khush (1973) y en el caso específico de la remolacha azucarera a Romagosa (1982). De la tesis doctoral de éste último se cita por su interés la tabla I en la que se recogen 61 especies de plantas en las que se han obtenido trisómicos, 24 de las cuales tienen la serie comple

Tabla I. Trisomicos primarios en especies de plantas

Especies	Forma de reproducción	Número de cromosomas	Serie completas	Origen	Referencias
<u>Amaranthus tricolor</u>	A-C	32		1	Madhusoodanan and Pal (1977)
<u>Antirrhinum majus</u>	A	16	↓	1,4	Rudolf-Lauritzen (1958)
<u>Arabidopsis thaliana</u>	A	10	↓	4	Steinitz-Seare (1963)
<u>Arachis hypogaea</u>	C	40		2	Patil (1968)
<u>Avena sativa</u>	C	42		1	Hacker and Riley (1963)
<u>Avena striosa</u>	C	14	↓	3	Dyck (1964)
<u>Beta vulgaris</u>	A	18	↓	4	Butterfass (1964)
<u>Brassica carinata</u>	A-C	34		—	Dhesi and Lobana (1974)
<u>Capsicum annum</u>	C	24		3,5	Pochard (1968)
<u>Clarkia unguiculata</u>	B	18	↓	4	Vasek (1956)
<u>Coix aquatica</u>	A	10		1	Rao (1976)
<u>Collinsia heterophylla</u>	A	14		4	Ohlson and Garber (1960)
<u>Collinsia tinctoria</u>	A	14		4	Garber (1964)
<u>Corchorus olitorius</u>	C	14	↓	1,3,4	Paris and Basak (1979)
<u>Crepis capillaris</u>	A	6		1,2,4	Bobcock and Havaishin (1930)
<u>Crepis tectorum</u>	A	4		—	Gerassimova (1940)
<u>Cyanopsis psoraloides</u>	A	14	↓	3	Singh (1972)
<u>Dactylis glomerata</u>	A	28		3	Shah (1964)
<u>Datura stramonium</u>	C	24	↓	1,2,4	Blakeslee and Belling (1924)
<u>Fertuca arundinacea</u>	A	42		1	Jauhar (1978)
<u>Fraxia sp.</u>	A	14		3	Yarnell (1931)
<u>Glycine max</u>	C	40		3	Palmer (1976)
<u>Gossypium barbadense</u>	C	52		5	Endrizzi (1966)
<u>Gossypium hirsutum</u>	C	52		1	Kohel (1966)
<u>Hordeum spontaneum</u>	C	14	↓	4	Tsuchiya (1959)
<u>Hordeum vulgare</u>	C	14	↓	1,2,4	Tsuchiya (1967)
<u>Humulus lupulus</u>	A	20		4	Haumold (1968)
<u>Iberia sp.</u>	A	14		1	Ens (1968)
<u>Lathyrus odoratus</u>	A	14		—	Ohri and Mezeer (1979)
<u>Lolium perenne</u>	A	14		4	Ahlcownia (1972)
<u>Lotus podunculetus</u>	A	12	↓	4	Chen and Grant (1968a)
<u>Lyconersicum esculentum</u>	C	24	↓	1,2,4	Rick and Barton (1954)
<u>Lyconersicum peruvianum</u>	A	24		4	Remulu et al. (1978)

Tabla 1. (continuación)

Especies	Forma de reproducción	Número de cromosomas	Serie completas	Origen	Referencias
<u>Matthiola incana</u>	C	14		1	Frost and Mann (1924)
<u>Medicago sativa</u>	A	16	↓	4	Buss and Cleveland (1971)
<u>Medicago sativa</u>	A	32		4	Kasha and McLennan (1967)
<u>Nicotiana glauca</u>	B-C	24	↓	1,2,3,4	Goodspeed and Avery (1939)
<u>Nicotiana glauca</u>	C	48		5	Ree and Stokes (1963)
<u>Oenothera lamarckiana</u>	A	14		2	Arnold and Kressel (1965)
<u>Oenothera biennis</u>	A	14	↓	4	Herzog (1940)
<u>Oenothera biennis</u>	A	14	↓	2,4	Catcheside (1954)
<u>Oenothera lamarckiana</u>	A	14		4	Emerson (1936)
<u>Oryza sativa</u>	C	14	↓	2,4	Hu (1968)
<u>Pennisetum typhoides</u>	A	14	↓	4	Gill et al. (1970)
<u>Petunia sp.</u>	A	14		4	Levan (1937)
<u>Phaseolus sativus</u>	C	14		3	Koller (1938)
<u>Populus tremula</u>	A	57		4	Johnson (1942)
<u>Potentilla arguta</u>	A	14		4	Asker (1971)
<u>Ricinus communis</u>	A-C	20		6	Jakob (1963)
<u>Sesame indicum</u>	A	14	↓	1,4	Kamanoi and Jenkins (1962)
<u>Sesame indicum</u>	A-C	26		1	Subrahmaniam (1977)
<u>Solanum chacoense</u>	A-C	24		4,6	Lem and Erickson (1971)
<u>Solanum tuberosum</u>	C-B	48		6	Frandsen (1967)
<u>Solanum tuberosum</u>	C-B	24	↓	4,6	Wagenboort and Ramanna (1979)
<u>Sorghum bicolor</u>	C	20	↓	4	Hanna and Schertz (1970)
<u>Sorghum vulgare</u> <sup>+</sup>	C	20		4,5	Lin and Ross (1969)
<u>Spinacia oleracea</u>	A	48	↓	4	Tabushi (1958)
<u>Taraxacum officinale</u>	A	24		1	Lin and Chen (1981)
<u>Trigonotis corniculata</u>	-	16		1	Singh and Singh (1978)
<u>Triticum aestivum</u>	C	42	↓	5	Sears (1939)
<u>Verbena tenuisecta</u>	A	10		4	Arora and Khoshoor (1969)
<u>Zea mays</u>	A	20	↓	4	McClintock (1929)

<sup>+</sup>Sorghum vulgare Pers = Sorghum bicolor (L.) Moench.

Forma de reproducción (Frixell, 1957) (A) alogama; (B) vegetativa; (C) autogama.

Origen: (1) espontáneo; (2) inducido por agentes físicos y químicos; (3) de mutantes asinópticos y disnópticos; (4) de progenies de triploides; (5) de progenies de haploides; (6) de progenies de autotetraploides.

### 3. Trisómicos primarios en remolacha

La primera descripción morfológica de trisómicos primarios de Beta vulgaris L. fue la de Levan (1942) el cual aisló 62 plantas trisómicas de cruces triploides por triploide, diploide por triploide y triploide por diploide. Las plantas triploides que utilizaba como fuente de trisómicos eran altamente homocigóticas, pero los trisómicos aparecieron en cruces entre diploides y triploides de seis líneas diferentes, por lo que pocos trisómicos eran verdaderamente homocigotos. Fueron clasificadas dentro de cinco grupos morfológicos, 30 plantas, mientras las 32 restantes no se supo a que grupo adscribir las.

Mochizuki (1953), Linde-Laursen (1964) y Takahashi y col. (1968) aislaron trisómicos de materiales comerciales heterocigóticos, pero no identificaron grupos.

Por el contrario Butterfass (1964) identificó 8 grupos morfológicos, mediante análisis morfométrico y conteo de cloroplastos a partir de 59 plantas trisómicas obtenidas de 624 plantas de cruces triploide por diploide en una población altamente heterocigótica. Posteriormente identificó el grupo 9 en el mismo material. Sin embargo, la heterogeneidad del material hizo prácticamente imposible la identificación de algunas plantas.

Kaltsikes (1966) y Kaltsikes y Evans (1967) fueron los primeros en utilizar material homocigótico. Aislaron 11 plantas trisómicas en un cruce triploide por diploide, separando 4 de ellas en tres grupos morfológicos.

Una serie completa a partir de material heterocigótico fue aislada por Ishimura (1972) la cual obtuvo 77 plantas trisómicas que separó en nueve tipos morfológicos. Comunicación personal posterior de la autora nos ha hecho conocer la pérdida de esta serie trisómica.

Poco más tarde Bormotov et al (1973) también aislaban algunos tipos tri  
micos.

Ultimamente Romagosa (1982) obtuvo, e identificó morfológicamente a partir de un material homocigótico, los nueve grupos de trisómicos de remolacha, dentro del proyecto cooperativo hispano-norteamericano IIIF-3040 desarrollado conjuntamente en el Crops Research Laboratory de Colorado State University en Fort Collins U.S.A. y la Estación Experimental de Aula Dei del C.S.I.C. en Zaragoza, España. Esta serie, junto a la conservada de Butterfass (1964) por Pilar Gracia en la Estación Experimental de Aula Dei, son el objeto de estudio de este trabajo.



#### 4. Utilización de trisómicos primarios

Los trisómicos primarios son un excelente instrumento para testar la independencia de grupos de ligamiento y para adscribirlos a determinados cromosomas. En remolacha azucarera los símbolos génicos y las tentativas de grupos de ligamientos conocidos hasta el momento, fueron agrupados por Smith (1980) y se muestran en la tabla II.

Además de la utilidad en estudios genéticos, los diversos tipos de trisómicos pueden servir para estudiar la influencia de la duplicación total o parcial de un cromosoma en la morfología, anatomía o fisiología del organismo.

Los trisómicos primarios son también útiles en la identificación de cromosomas involucrados en traslocaciones. La aparición de pentavalentes en lugar de trivalentes, puede indicarlo.

Tabla II. Caracteres y símbolos genéticos en remolacha (*Beta vulgaris* L.) (de G.A. Smith, 1900)

Grupo de ligamiento	Símbolo genético	Referencia	Carácter
I	<u>Y, Y<sup>F</sup>, y</u>	Kajanus (1917), Koller (1936)	Pigmentación amarilla
	<u>R, R<sup>t</sup>, R<sup>p</sup>, R<sup>h</sup>, r</u>	Kajanus (1917), Koller (1936)	Color hipocotilo
	<u>Cl, cl</u>	Owen y Ryser (1942)	Hoja coloreada
	<u>Ir, ir</u>	Owen y Ryser (1942)	Hoja manchada
	<u>Cv, cv</u>	Doming, Owen y Ryser (1942)	Nerviación coloreada
	<u>B, b</u>	Munerati (1931), Abegg (1936)	Hábito anual
	<u>B, b</u>	Owen y col (1942)	Hábito anual, pero menos efecto que B considerado alelico B.
	<u>V<sub>1</sub>, V<sub>1</sub></u>	Owen y Ryser (1942)	Follaje variegado
	<u>C, c</u>	Abegg y Owen (1936)	Resistencia parcialmente dominante al "curly top"
	<u>cr, cr<sup>+</sup></u>	Stewart*	Follaje arrugado, tamaño de planta reducido
II	<u>D, D</u>	Linda-Laurson (1972)	Ausencia de color
	<u>M, M, M<sup>Br</sup>, M<sup>1</sup>, M<sup>2</sup></u>	Savitsky (1950, 1952)	Semilla monogermen
	<u>tb</u>	Savitsky (1952)	Espigado tardío
III*	<u>C<sub>2</sub></u>	Savitsky y Murphy (1954)	Resistencia parcial al "curly top"
	<u>A<sub>1</sub>, A<sub>1</sub></u>	Owen (1952)	Androesterilidad mandarina
IV*	<u>Lu<sub>2</sub>, Lu<sub>2</sub></u>	Theurer (1968a)	Lutescencia, cotilédones verdes seguidos por muerte.
V*	<u>ru, Ru</u>	Owen y Ryser (1942)	Raíz rojiza
Sin determinar	<u>ch<sub>2</sub>, Ch<sub>2</sub></u>	Savitsky (1957)	Cotilédones cloróticos y hojas amarillo-verdosas
	<u>ch<sub>1</sub>, Ch<sub>1</sub></u>	Savitsky (1940)	Clorosis, mayor reducción en producción de raíz que el ch <sub>2</sub> .
	<u>vi<sub>A</sub>, vi<sub>A</sub></u>	Stender y Theurer (1970)	Virescencia, pronunciado retraso en producción de clorofila en el primer par de hojas reales, hojas de color blanco a verde claro.
	<u>X, X</u>	Owen (1945)	Restaurador de la androfertilidad en citoplasma estéril
	<u>Z, Z</u>	Owen (1942, 1945)	Produce fertilidad parcial en citoplasma estéril
	<u>Rf<sub>1</sub></u>	Theurer y Tysner (1969)	Restaurador de polen
	<u>Rf<sub>2</sub></u>	Theurer (1971)	Restaurador de polen anual
	<u>Rf<sub>3</sub></u>	Roundy y Theurer (1974)	Debil restaurador de polen aparecido en un mutante de hoja amarilla
	<u>Sh, sh</u>	Hagaboom (1957)	Aumento de producción de polen
	<u>yl, yl</u>	Roundy y Theurer (1974)	Hoja amarilla
	<u>bl, Bl</u>	Munerati y Costa (1930)	Raíz negra

Tabla II. (continuación)

Grupo de ligamiento	Símbolo genético	Referencia	Carácter
	<u>d, D</u>	Theurer (1968b)	Plantas maduras enanas, plantulas con hipocotilo grueso
	<u>p1, P1</u>	Abegg (1936)	Hoja lanceolada, nerviación semiparalela
	<u>s<sup>a</sup>, S<sup>b</sup></u>	Owen (1942)	Autofertilidad
	<u>s<sup>a</sup>, S<sup>f</sup></u>	Owen (1942)	Autosterilidad
	<u>s<sub>a</sub>, S<sub>b</sub>, S<sub>c</sub>, S<sub>d</sub></u>	Larsen (1977)	Autoincompatibilidad gametofítica con 4 loci
	<u>w, W</u>	Stewart*	Albino letal
	<u>v<sub>2</sub>, V<sub>2</sub></u>	Abegg (1940)	Cotiledones variegados
	<u>v<sub>3</sub>, V<sub>3</sub></u>	Abegg (1940)	Folleja variegado y raíz caruosa
	<u>f, F</u>	Stewart*	Hoja flecida
	<u>n, N</u>	Stewart*	Planta enana, hojas gruesas
	<u>m, M</u>	Abegg (1940)	Planta miniturna, letal conflictivo con monogermia
	<u>rs, Ro</u>	Savitsky*	Nuevas hojas de plantas maduras reducidas de tamaño y forma lanceolada
	<u>u<sub>1</sub>, U<sub>1</sub></u>	Savitsky (1957)	Plantulas albinas.
	<u>au, AU</u>	Savitsky (1957)	Cotiledones amarillo dorado, heterocigoto semiletal homocigoto letal
	<u>lu, Lu</u>	Savitsky (1957)	Lutescencia, hojas producidas después del segundo par pasan a ser progresivamente amarillas, algunas sobreviven.
	<u>vi<sub>1</sub>, vi<sub>2</sub>, vi<sub>3</sub></u>	Savitsky (1957)	Virescencia, plantas amarillo doradas, producción clorofila con varios grados de retraso.

\*Segun Abegg (1940)

+Butterfass (1960) lo clasificó como grupo de ligamiento II.

\*Asignación de grupo de ligamiento tentativa, basado en el hecho de que eran buenos marcadores genéticos no asociados con genes de los grupos I y II.

### 5. Paquitenas

En aquellas plantas cuyos cromosomas metafásicos mostraban dificultad de identificación por tamaño y posición centromérica se ha intentado el análisis paquiténico como método diferenciador. En la tabla III se muestran plantas estudiadas por este sistema, si bien a continuación se señala algún aspecto interesante de estos trabajos, sobre todo en relación a profases mitóticas.

El primer trabajo fue la descripción de McClintock (1929) de los bivalentes paquiténicos de maíz. Sin embargo fue Brown (1949) con sus estudios en tomate el que fijó los caracteres básicos del sistema. Llegó a la conclusión de que el centrómero estaba rodeado a ambos lados por zonas cromáticas con modelos cromoméricos específicos. Las partes distales son acromáticas y sus cromómeros son difíciles de detectar. Esta parte es aproximadamente la mitad del cromosoma. Los extremos de los cromosomas están terminados por telocromómeros. Las zonas acromáticas contribuyen muy poco a la longitud del cromosoma contraído. En resumen, llegó a la conclusión de que el modelo cromomérico de las zonas cromáticas era variable de un cromosoma a otro del complemento, y constante para un cromosoma en particular.

Barton (1950) amplió la obra de Brown haciendo el cariotipo completo y midiendo longitudes totales y longitudes de brazos. Describió también los cromómeros. A la vez hizo notar el principal defecto de los cariotipos paquiténicos, que es, la dificultad de conseguir todos los cromosomas en condición óptima en una misma célula, hecho que él sólo logró en una ocasión, puesto que en las demás sólo pudo elegir algún cromosoma.

Lima-de-Faria realizó diversos trabajos sobre paquitenas (1949, 1952a, 1952b, 1954, 1958, 1959), utilizando secale cereale, *Agapanthus umbellatus* y *Ornithogalum virens*. Presenta una descripción detallada de los cromómeros de cada bivalente, afirmando que la distancia en micras entre los centros de dos

TABLA III. Especies en las que se ha realizado el cariotipo paquiténico.

<i>Agapanthus umbellatus</i>	Lima-de-Faria (1954)
<i>Antirrhinum majus</i>	Ernst (1939)
<i>Atylosia lineata</i>	Reddy (1981)
<i>Beta procumbens</i>	De Jong y Elom (1981)
<i>Beta vulgaris</i>	Nakamura y Tsuchiya (1982)
<i>Brassica</i> (varias especies)	Röbbelen (1960)
<i>Cajanus cajan</i>	Reddy (1981)
<i>Hordeum vulgare</i>	Servella y col. (1958)
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Barton (1950)
<i>Medicago murex</i>	Lesins y col. (1970)
<i>Medicago sativa</i>	Gillies (1968, 1971)
<i>Ornithogalum virens</i>	Lima-de-Faria (1959)
<i>Oryza sativa</i>	Kurata y col. (1981)
<i>Plantago ovata</i>	Hyde (1953)
<i>Prunus avium</i>	Whelan (1969)
<i>Prunus persica</i>	Jelenkovic y Harrington (1972)
<i>Ricinus communis</i>	Jacob (1956)
<i>Rubus parvifolius</i>	Bamdi (1965)
<i>Secale cereale</i>	Lima-de-Faria (1952 a)
<i>Solanum canasense</i>	Haynes (1964)
<i>Solanum chacoense</i>	Lam y Erikson (1968)
<i>Solanum tuberosum</i>	Ramanna y Wagenvoort (1976)
<i>Sorghum intrans</i>	Garber (1947)
<i>Zea mays</i>	McClintock (1929)

cromómeros consecutivos, decrece con el incremento en tamaño del cromómero. y un gradiente en el tamaño de los cromómeros partiendo del centrómero y es to mismo ocurre en profase mitótica. En *Agapanthus* mide paquitenas medias y finales, profase II y profase mitótica y opina que la razón entre brazos y la razón entre longitud cromosómica y número cromomérico es de similar magnitud.

La constitución cromomérica de los telómeros es fija (Lima-de-Faria, 1958). La diferencia en el número de cromómeros no puede deberse a simple condensación de los mismos. Opina que los mismos segmentos de un cromosoma están organizados de diferente forma en distintos tejidos.

Las paquitenas han sido empleadas con distintos fines, así McDonald (1961) las utiliza para localizar una traslocación en el cromosoma cinco de *ca* bada.

Whelan (1969) trabajando con *Prunus avium* L. dice que si bien los centró meros son localizados fácilmente, no es posible detectar telocromómeros en nin gún cromosoma.

Jelenkovic y Harrington (1972) realizando el cariotipo paquiténico de *Prunus persica* (L). Batsch, llegan a la conclusión de que hay dos cromosomas implicados en el organizador nucleolar.

Wagenvoort y Ramanna (1979) utilizan las paquitenas en sus estudios de la serie trisómica de *Solanum tuberosum* L.

Por fin, es interesante citar también, el trabajo de Maguire (1977) por la duda que introduce en la utilización de cromómeros. La región del satélite en el cromosoma 6 del maíz, varía en el número de cromómeros visibles. En di- ferentes células de la misma planta se encontró que variaba desde 1 a 5. Sin embargo los homólogos sí que coinciden normalmente en el modelo cromomérico.

Enfatiza el hecho de que la común asunción de que los cromómeros paquiténicos son genéticamente constantes de célula a célula, no está justificada y que los modelos cromoméricos alternativos, pueden reflejar diferentes agregaciones, durante la condensación de las subunidades.

#### 6. Cariotipos paquiténicos en el género Beta.

El primer trabajo sobre bivalentes de Beta es el de Lawitsky (1927). Nagl (1969) midió el bivalente paquiténico del organizador nucleolar en Beta procumbens, y Walla (1971) hizo un amplio estudio de la profase meiótica del género Beta.

Nakamura y Tsuchiya (1976) proponen la posibilidad de realizar un cariotipo paquiténico. Yu (1977) lo hace con una línea homocigótica. Encuentra un rango en la medida de los bivalentes entre 12,4 y 33,7 con una longitud total de 214,3 micras. El complemento consiste en tres bivalentes de posición centromérica mediana y seis submedianas. El modelo de distribución cromomérico es noproximal.

Nakamura y Tsuchiya (1979, 1982) identifican los nueve bivalentes en función de longitud, razón de brazos, modelos diferenciales de eucromatina y heterocromatina. Los numeran en función directa del tamaño. El centrómero sólo parece confundirse en el 8 y en el 9. El genoma consta de cuatro metacéntricos y 5 submetacéntricos. El cromosoma más largo es alrededor de 1,6 veces el más corto. Las longitudes de los brazos cortos y largos son más variables en los cromosomas 1,2,3 y 4 que en los más cortos a excepción del cromosoma 9. También parece que la variación fue más grande en el brazo corto que en el brazo largo y que los cromosomas submetacéntricos con un r de más de 1,7 eran más variables en la razón de brazos que los cromosomas metacéntricos, excepción hecha del cromosoma 3.

Este cariotipo paquiténico fue comparado con el somático de Bosemark y Smolov (1971). El cromosoma más corto en paquitena era el 63% del más largo. En metafase somática era el 70%. La  $r$  varía de 1,16 a 2,43 en paquitena, mientras que va de 1,13 a 1,72 en metafase somática. En paquitena hay 4 metacéntricos y 5 submetacéntricos, mientras que en metafase hay 7 metacéntricos y sólo 2 submetacéntricos.

De Jong y Blom (1981) presentan un estudio de los cromosomas paquiténicos en *Beta procumbens*. La longitud cromosómica varía de 19,4 a 36,6 micras que mide el más largo.

Dicen que los cromosomas 2,3,7,8 y 9 son fácilmente reconocibles mientras que 1,4,5 y 6 muestran gran variación y no contienen ningún punto fijo sobre el que orientarse. Estudiando diez bivalentes del cromosoma uno, concluyen que diferentes proporciones de contracción ocurren no sólo entre cromosomas sino también entre el brazo corto y el brazo largo. La mitad distal del brazo largo de los cromosomas 2,3 y 7 y los cromosomas totales 5 y 6 muestran alta contracción, mientras que la muestran baja, los brazos cortos de 2,7 y 8 y la totalidad del 9. Ya Brown (1949), opinaba que las regiones heterocromáticas acortan mucho más lentamente que las eucromáticas. Este fenómeno puede también explicar porqué las diferencias de longitud de los cromosomas en paquitena son más extremas que en metafase mitótica, y también porqué los cromosomas 2,3,7 y 8 tienen una posición del centrómero más mediana en estados altamente condensados.

## 7. Longitud del cromosoma durante la mitosis

Colombo (1952) mide las longitudes de los cromosomas durante los ciclos mitóticos y meióticos en células germinales masculinas del ortóptero *Anacridium aegyptium*. Dice "considerando un único cromosoma, si vamos de la prometafase a la metafase mitótica, el acortamiento del cromosoma más largo es mayor de lo



que es el del cromosoma más corto; en la meiosis, de la cigotena a la paquita na el acortamiento es mayor en el más corto".

Bajer (1959) estudia el proceso de contracción de los cromosomas en la mitosis utilizando células vivas de *Haemanthus Katharinae* Bak. y *Leucojum aestivum* L. Los cromosomas comienzan a decrecer rápidamente en longitud antes de la disolución de la membrana nuclear y luego continúan decreciendo hasta la metafase donde paran. Vuelven a decrecer otra vez en anafase, aunque no ocurre esto en *Leucojum*. Este carácter variará de unas especies a otras. Piensa que la colchicina puede variar sustancialmente el modelo de contracción (Holm and Bajer, 1966).

Los cromosomas homólogos pueden tener débiles diferencias de longitud en tra células o incluso dentro de células, pero son demasiado pequeñas para no considerar que los homólogos están en el mismo estado de condensación. Svardson (1945) ya hablaba de que la contracción del brazo corto y el brazo largo puede ser independiente, acortándose más rápidamente el brazo corto en el caso de su especie, que era *Salmo alpinus*.

Wickbom (1949) trabajando con *Bufo bufo*, *Salamandra salamandra* e *Hyla arborea* llega a la conclusión de que entre profase temprana y media el acorta-miento es proporcionalmente mucho más grande en los cromosomas pequeños que en los grandes. Entre profase media y metafase, son los grandes los que sufren una mayor condensación. Sin embargo Bajer no encuentra esto en *Haemanthus* y los cromosomas acortan de una manera similar en todos los estados independientemente de sus dimensiones. El dato de las diferencias entre brazos no pueda darlo pues to que no localiza correctamente el centrómero.

Ohnuki (1968) presenta su artículo sobre las espirales de los cromosomas en el que habla de la forma de éstas tanto en profase como prometafase. El nú-mero de giros es probablemente constante en cromosomas homólogos de diferentes

células. Las espirales del cromosoma se empiezan a ver bien en profase tardía y metafase. El número de giros está estrictamente en relación con el grado de condensación del cromosoma. Además este número es constante para un determinado cromosoma y su homólogo de unas células a otras.

#### 6. Cromómeros y heterocromatina

Como resumen de lo dicho hasta ahora, podemos citar a Rees y Jones (1977) transcribiendo literalmente "la espiralización diferencial de segmentos en cromosomas lambrush y politénicos, encuentra un paralelismo en los cromómeros, los cuales dan una apariencia bandeadas a los cromosomas profásicos, especialmente en la meiosis paquítenica. Es importante notar sin embargo, que mientras el modo cromomérico de profase es específico y característico de una especie, puede variar substancialmente de un estado de desarrollo a otro. Por ejemplo haya menudo una acusada reducción en el número de cromómeros en la profase de la segunda división de la meiosis en comparación con la primera división".

Lewin (1980) opina que la posición de cada cromómero es relativamente constante para cada cromosoma. Probablemente ellos reflejan la forma local de enrollamiento del cromosoma. Durante los estados más condensados una serie característica de "bandas" pueda ser generada en cada cromosoma por distintos tratamientos.

El ADN que se considera como patrón por ser el mayoritario en el núcleo, constituye la eucromatina (Heitz, 1928) y aquel que muestra distinto comportamiento con relación a él, se denomina heterocromatina (Heitz, 1928, 1929).

Cromómeros para Wilson (1925) son partículas discretas de cromatina de tamaño y forma variables ordenadas linealmente a lo largo del cromosoma. Para

Lima-de-Faria (1975), cromómero es la más pequeña unidad estructural vista en los cromosomas eucarióticos bajo la luz del microscopio en profase de mitosis y meiosis.

Al entrar a hablar de la utilización de cromómeros y heterocromatina en la identificación cromosómica, podemos citar a Tjio y Levan (1950) cuando comentan el uso de la oxiquinoleína. Dicen de ella que clarifica la organización de los cromosomas en profase, especialmente en lo que concierne a la distinción entre hetero- y eu-cromatina.

Solo encuentran heterocromatina estudiable en plantas como Vicia, cebada, centeno y triticales. Nada dicen de trigos y remolacha. El centeno es una planta estupenda para ser estudiada en profase. La aparición de heterocromatina y eucromatina puede estar relacionada con la prematura contracción cromosómica producida por la oxiquinoleína. Los cromosomas contraen mientras la eucromatina está todavía debilmente teñida, y por eso la heterocromatina aparece claramente.

Para Haga y Kurabayashi (1952), segmentos específicos de cromosomas, por tratamientos con frío, pasan progresivamente de tinción normal a baja tinción y condición laxa.

La constancia final del modelo quedó establecida entre homólogos en la misma célula, entre los mismos pares en diferentes células de un individuo y entre los cromosomas de diferentes especies conteniendo el mismo tipo de cromosomas. Los modelos de diferenciación eran característicos para cada juego de cromosomas.

Tanaka (1967) utiliza las zonas heterocromáticas que aparecen en profase tardía en *Haplopeppus gracilis*, como comparación entre homólogos. Yonezawa (1981) utiliza el mismo método en la misma planta para demostrar la trasposición de un centrómero.

Lee y Hanneman (1976) analizan cuatro trisómicos secundarios en *Solanum chacoense* Bitt., que habiendo sido identificados por análisis paquiténico, lo sonen esta ocasión en profase tardía. Las irregularidades cromáticas son la mejor característica para identificar los cromosomas.

Kurata y Omura (1978) en *Oriza sativa* L. utilizan prometafases pretratadas con enzimas. El tamaño de los cromosomas tratados con oxiquinoleína 0,002 M, de las a tres horas en metafase va desde 1,0 a 1,9 micras. En prometafase, la amplitud es de 1,5 a 4,1 micras.

Chiang et al. (1979) tienen un caso similar al anterior en *Brassica oleracea* ssp. capitata, y lo resuelven utilizando prometafases sin tratar.

Las técnicas de bandeado han tenido resultados muy limitados en plantas, por lo que no ha sido posible compararlas con cromómeros somáticos o paquiténicos. No ocurre lo mismo con los cromosomas de mamíferos, donde existen diversos trabajos.

Okada y Comings (1974) comparan los modelos de bandas G de los cromosomas mitóticos 1 y 2 del hamster chino con los modelos cromoméricos de los bivalentes paquiténicos, llegando a la conclusión de que son muy cercanos. Esto lo interpretan como que las regiones de heterocromatina centromérica e intercalares que están más apretadas o condensadas durante la interfase, tienden a permanecer así durante la mitosis y la meiosis.

Luciani et al. (1975) obtiene todo el cariotipo paquiténico humano con bandas G previa digestión por tripsina. Sus resultados muestran la equivalencia con los modelos de bandas G mitóticos.

También se ha trabajado con prometafases con el fin de aumentar el número de bandas G. Patterson y Petriccioni (1973) presentan un estudio comparativo de

los cromosomas en metafase y profase tardía del ciervo muntjak teñidos para obtener bandas G. Una banda grande en metafase, se divide en varias pequeñas en profase.

Yunis et al. (1980) comparan el cariotipo mitótico de bandas G humano con el del chimpancé, demostrando su similitud, pero para aumentar el número de bandas comparativas, trabajan en profase tardía o prometafase.

Yu et al. (1981) obtienen una alta resolución en el número de bandas de cromosomas de fibroblastos humanos tratados con actinomicina D previamente a un bandeado con Giemsa y tripsina.

En último lugar, puede ser interesante comentar el artículo de Greilhuber (1977) en el que analiza el falló de las bandas G en cromosomas de plantas. En opinión de este autor, las bandas obtenidas hasta el momento son heterocromatina constitutiva, en particular C-bandas. El alto grado de concentración, es la razón por la que no aparecen bandas G. Los cromosomas de mamíferos, están menos contraídos en mitosis. La distancia entre cromómeros en ellos sería alrededor de 0,6 micras, mientras que en plantas la distancia hipotética sería de 0,1 micras, lo cual no puede ser resuelto a la luz del microscopio óptico.

Los artículos comentados antes hablan sobre el gran número de bandas que se encuentran en profase en los cromosomas de mamíferos. Greilhuber opina que hay que buscar el momento de la profase mitótica de plantas en la que las bandas están en el adecuado estado de concentración.

#### 9. Problemas de medidas en cariotipos

Sybenga (1959) estudió tres fuentes de variación en las medidas de cariotipos cromosómicos. Estas fueron, el aumento fotográfico, la dureza del squash

y el tipo de droga (colchicina, oxiquinoleína y bromonaftaleno). El último punto considero que no producía variación. El squash produjo un significativo incremento en la longitud del cromosoma, con la particularidad de que el aumento parece ser mayor en los brazos largos. El tipo de aumento utilizado puede llegar a ser importante si la planta tiene los cromosomas pequeños, por lo que considera útil la repetición de las medidas.

Sasaki (1961) estudia la modificación en el tamaño y la forma de los cromosomas debido a diferentes horas de tratamiento con colchicina, en cromosomas somáticos de mamíferos. Los cromosomas altamente contraídos tienden a tener sus centómeros más centrales que otros menos contraídos en diferentes células. Los cromosomas más largos tienden a contraerse más fuertemente que los cortos en la misma célula. Sugiere que el proceso de condensación cromatídica artificial puede no ser uniforme en todos los cromosomas en un estado dado del ciclo mitótico.

Matern y Simak (1968) para demostrar estadísticamente que la variación en longitud de los cromosomas causada por artefactos es a menudo mucho más grande que la variación genética, estudian idiogramas de *Larix decidua*, en cuanto a longitudes de dos cromosomas. Una diferencia entre las distribuciones de las longitudes de dos cromosomas puede no ser descubierta, en una muestra grande, si la diferencia media observada entre el cromosoma más grande y el más pequeño, es menor del 8% de la longitud media de los dos cromosomas. El riesgo de inversión puede no ser indiferente si la diferencia media es menor del 11% de la longitud media de los dos cromosomas.

En relación a longitudes de los brazos de un cromosoma, las distribuciones pueden no ser distinguidas unas de otras, si la diferencia media es menor que el 15% de la longitud media de un brazo. El riesgo de inversión puede no ser indiferente, si la diferencia media es menor que el 20% de la longitud media.

A la vista de los conocimientos existentes en la actualidad sobre la citogenética de la remolacha azucarera, y basados también en las necesidades del programa de investigación cooperativa reseñado anteriormente, hemos elegido pa ra la presente tesis doctoral los objetivos que a continuación se reseñan.

## II. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral pueden dividirse en dos grandes partados:

a. Desarrollo y aplicación de técnicas citológicas que permitan la identificación positiva de los distintos componentes del complemento cromosómico de Beta vulgaris L. Este objetivo se subdivide en:

1. Obtención del Cariotipo metafásico en diploides.
2. Obtención de haploides como situación óptima para estudiar diferencias entre los nueve tipos cromosómicos.
3. Obtención del cariotipo prometafásico en diploides.
4. Obtención del cariotipo profásico. Posibilidad y utilidad en diploides.
5. Diferencias entre metafases, prometafases y profases.
6. Estudio de la contracción del cromosoma.

b. Identificación positiva de cada uno de los nueve componentes de la serie trisómica primaria de Beta vulgaris L. a través de técnicas citológicas. Este objetivo puede subdividirse en:

1. Obtención de placas cariotípicas de plantas trisómicas.
2. Determinar que cromosomas está triplicado en cada uno de los nueve grupos morfológicos de la línea homocigótica trisómica de I. Romagosa.
3. Comprobar si existe alguna anomalía cromosómica en la línea trisómica de Butterfass.



### III. MATERIAL Y METODOS

#### 1. Material vegetal

##### a. Haploides

Hasta el momento el aislamiento de remolachas haploides ( $n=9$ ), sigue procedimientos bastante tediosos. Levan (1945) fue el primero en describir una remolacha haploide. Posteriormente otros autores como Zimmermann (1953), Fischer (1956, 1962), Butterfass (1959), Kruse (1961, 1963) y Hammond (1966) encontraron otras plantas utilizando métodos como:

- a) progenies de plantas tratadas con agentes diploidizantes.
- b) aislamiento de gemelos en semillas de variedades diploides o anisoploides.
- c) de diploides androestériles citoplásmicos.
- d) de anisoploides.

Bosemark (1971) y Yüce (1973) incrementaron el porcentaje de producción de haploides por medio de cruzamientos interespecíficos o polinizando con polen irradiado. Yüce concluyó de sus resultados, que las plantas androestériles muestran una mayor tendencia para el desarrollo partenogenético que las plantas fértiles. Sin embargo, no quedó claro si esto es debido al citoplasma androestéril o si independientemente de él, un genotipo particular puede inducir alto grado de aparición de haploides.

Para el presente trabajo hemos utilizado cruzamientos similares a los descritos por Bosemark (1971) y Yüce (1973) realizados por Lasa en 1974, entre plantas diploides androestériles génico-citoplásmicas de hipocotilo verde, con plantas forrajeras tetraploides homocigóticas para el gen dominante de hipocotilo rojo. La mayor parte de las plántulas obtenidas por nosotros presen

taron hipocotilo rojo, y unas pocas, verde. Estas últimas fueron controladas cromosómicamente, apareciendo diploides, triploides, aneuploides y en muy baja proporción algún haploide.

#### b. Diploides

Como material de estudio, se empleó la AD-41, población de muy amplia base genética, diploide, multigermen, de origen polaco y perfectamente adaptada a las condiciones españolas, ya empleada con anterioridad en la tesis de licenciatura del presente autor.

#### c. Trisómicos

Tal como se describe en los objetivos de la presente tesis doctoral se han empleado las dos series de trisómicos primarios de remolacha azucarera existentes en la actualidad.

Por un lado, la obtenida a través del proyecto cooperativo hispano-norteamericano 3P-3040, ya descrita por Romagosa (1982). Esta serie trisómica es homogótica puesto que proviene de cruzamientos entre triploides y diploides, derivados de un haploide obtenido por Hammond (1966) encontrado en la descendencia de una línea altamente consanguínea, NB1 desarrollada por el USDA (McFurlana, 1954).

Por otro, la desarrollada por Butterfass (1964) complementada posteriormente en su noveno tipo, obtenida en materiales muy heterocigóticos y que ha sido conservada en la Estación Experimental de Aula Dei.

## 2. Métodos

### a. Identificación rutinaria del número cromosómico

Se han empleado técnicas sobre primordio foliar, con toma del material a primeras horas del día y tamaño del primordio elegido entre 2 y 5 mm. La toma se ha realizado directamente sobre oxiquinoleína 0,002 M (Tjio y Levan, 1950). Este pretratamiento se prolongó durante 3 horas, ya que el conteo exacto del número cromosómico se facilita con la alta contracción de los cromosomas. Posterior fijación en Carnoy 3:1, con conservación, si es necesaria, en alcohol. La tinción se ha realizado por el método de Tjio y Levan (1956) modificado por Rommel por tratamiento en frío durante 24 horas con la orceína acética. El squash se realiza sobre gota de acético al 45%.

### b. Métodos de obtención de meristemo radicular

Se han utilizado dos técnicas diferentes según el material problema.

En el caso de diploides y por la abundancia de material se ha tomado sobre semilla germinada en arena, con posterior crecimiento en agua burbujeante (Cistué, 1979).

En el caso de plantas trisómicas y haploides, el sistema utilizado se basa en la obtención de nuevas raíces en maceta tras limpieza de las antiguas, por secado del cepellón y posterior estancia durante tres o cuatro días en crecimiento óptimo.

### c. Obtención de metafases.

El meristemo radicular se sitúa directamente sobre oxiquinoleína

0,002 M durante 2 horas y media. A continuación se fija en Carnoy 3:1 al menos 24 hrs. Dada la dureza del material, éste se hidroliza en ClH 1N a 60°C durante 5 minutos con posterior lavado en agua destilada. Se tiñe en orceina lacto propiónica (Dyer, 1963), modificada por Basemark (1972) en la duración, que se sitúa entre 30 y 60 minutos. El squash sobre gota de orceina lacto propiónica.

#### d. Obtención de prometafases

En este caso los pretratamientos han sido muy variables empleándose en algunos casos oxiquinoleína 0,002 M durante 2 hrs. En otros, tratamiento en agua con hielo durante 2 hrs. y por fin en algunos, ningún pretratamiento. En cuanto a fijación, hidrólisis y tinción, las técnicas han sido similares a las descritas en metafases.

#### e. Obtención de profases

En este caso el material no ha sufrido pretratamiento ya que únicamente, en algunas ocasiones, se mantuvieron los meristemas radiculares durante unos 15 minutos en agua con hielo.

Las técnicas de fijación, hidrólisis y tinción han sido similares a las descritas para metafases, aun cuando en este último punto, en algunas ocasiones, se ha incrementado la misma por empleo de colorante de Giemsa tras el levantamiento del cubre (Conger y Fairchild, 1953), deshidratación y nueva tinción en Giemsa 9204 de Merck, diluido al 1-2% en tampón fosfato sodio-potasio.

f. Bandas G.

Tras pretratamiento en oxiquinoleína 0.002 M. durante 2 horas y media y fijación en Carnoy 3:1, se realiza squash sobre acético al 45 %, tras mantener el material en el citado acético durante 1-2 horas para maceración. Se emplearon las técnicas de Gill y Kimber (1974), Singh y Lalley (1975), Noda y Kasha (1976), de Jong y De Bock (1978) y Giraldez y Orellana (1979), con modificaciones en cuanto a duración de los diversos tratamientos.

g. Preparaciones permanentes

En conteos rutinarios se emplea la técnica de semipermanencia de Rattenbury (1956).

En los demás casos se ha empleado la separación de cobre por el método de Conger y Fairchild (1953), con posterior deshidratación y montaje en Euparal.

h. Técnicas fotográficas

Las fotografías se han realizado en microscopio Zeiss Standard universal, con objetivo Neofluar 63/1.25 Oel., con aumento en tubo de 1,25, angular intermedio de 12,5 y ampliación en placa de 3,2.

Se emplea placa tipo Velcalith 25 con revelado a base de Dokumol durante 3 minutos y positivado sobre papel Kodak Estamatic SC con procesado automático.

i. Medidas

Se han realizado siempre sobre positivo, con traducción a escala real, por fotografía interpuesta de porta micrométrico.

En el caso de metafases y prometafases, los parámetros empleados han sido, la longitud total del cromosoma, las parciales de sus brazos, así como la razón entre los mismos ( $r$ ). En el caso de profases, junto a las medidas anteriores se han analizado las distancias entre el centrómero y el punto medio de los cromómeros más significativos.

#### j. Análisis estadístico de los resultados

Para la comparación entre cromosomas se ha empleado el análisis de varianza con ordenación por Duncan al 95%.

La comparación de medias se ha realizado mediante  $t$  de Student.

El ajuste de contracción cromosómica se verifica a través de 3 tipos de curvas, lineal  $y = a + bx$ , exponencial  $y = ae^{bx}$  y logarítmica  $y = a + b \ln x$  (Steel y Torrie, 1961).



#### IV. RESULTADOS

##### 1. Cariotipo metafásico en diploides

Como hemos comentado ya anteriormente, la obtención de buenas placas metafásicas es extremadamente rara. Por ello, para este estudio, hemos ido eligiendo a lo largo de todo el periodo de realización del trabajo, aquellos cariotipos que consideramos más representativos.

Todo este apartado, incluye exclusivamente placas metafásicas, provenientes de raíces que habían sido tratadas durante dos horas y media con 8-hidroxi-quinoleína 0,002 M. El aspecto de los cromosomas como resultado de este tratamiento es extremadamente pequeño, tal como aparece en la fotografía 1, que es la célula 76, la cual ha sido escogida como muestra de las 15 que analizamos.

Los resultados se presentan en las tablas IV y V que muestran respectivamente el análisis de las 15 células, y de las 5 escogidas como mejores de entre las 15. Los parámetros utilizados, son los ya explicados en el apartado de métodos.



FOT. 1 Metafase de la célula 76. Tratamiento de 2 horas y media con oxiquino  
leina 0'002 M.

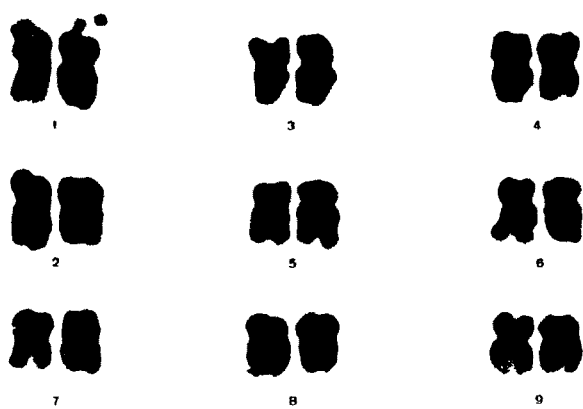


TABLA IV. Análisis de 15 cariotipos metafásicos

Cromosoma	L%	L%-Tr.	D.	r	D.	Id.
1	11.93	20.22	b	1.68	a	Si
2	12.60	20.81	a	1.50	b	Si
3	11.97	20.25	b	1.23	c	Si
4	11.40	19.72	c	1.15	c	Si
5	11.05	19.42	d	1.69	a	Si
6	10.82	19.22	dc	1.40	b	Si
7	10.55	18.95	e	1.13	c	Si
8	10.06	18.49	f	1.50	b	Si
9	9.60	18.05	g	1.79	a	Si

F (8,126) para longitudes transformadas, entre cromosomas = 72.08 \*\*\*

F (8,112) para r, entre cromosomas = 38.17 \*\*\*

F (14,112) para r, entre células = 1.63 NS

$$L\% = \frac{Li}{L} \cdot 100$$

$$L\% - Tr. = \arcsin \sqrt{L\%}$$

D. = Clase independiente por Duncan al 95 %.

r = Brazo largo partido por brazo corto.

ID. = Identificación de los 8 cromosomas restantes.

TABLA V. Análisis de 5 cariotipos metafásicos

Cromosoma	L%	L%-Tr.	D.	r	D.	Id.
1	11.84	20.16	b	1.76	a	Si
2	12.23	20.66	a	1.46	c	Si
3	11.80	20.10	b	1.26	d	3-4
4	11.39	19.72	bc	1.14	d	4-3
5	11.30	19.50	cd	1.65	abc	5-6
6	10.74	19.14	d	1.55	bc	6-5
7	10.78	19.16	d	1.10	d	Si
8	10.10	18.54	c	1.48	c	Si
9	9.76	18.22	c	1.72	ab	Si

F (8,36) para longitudes transformadas, entre cromosomas = 27.93 \*\*

F (8,32) para r, entre cromosomas = 15.80 \*\*

F (4,32) para r, entre células = 0.64 NS

## 2. Haploides

El sistema de obtención de haploides fue por medio de los cruzamientos explicados anteriormente, de los que se realizaron tres siembras, que arrojaron los siguientes resultados.

Siembra	1ª	2ª	3ª	Total
Nº semillas	3.200	5.200	10.000	18.200
Nacidas	234	1.465	3.569	5.268
Verdes	17	35	99	152
Haploides	0	0	1	1

La planta haploide obtenida, fue perfectamente viable, y de gran vitalidad.

Las raíces obtenidas fueron sometidas a distintos tratamientos. A continuación mostramos una serie de fotografías que representan el estado más corriente en el que se encuentran las células en división, de acuerdo al tratamiento recibido.

Fotografía	Célula	Tratamiento
2	209	2 hrs. 3/4 de oxiquinoleína
3	210	2 hrs. 1/4       "
4	205	2 hrs. en agua con hielo
5	212	2 hrs.       "       "       "

Los tratamientos anteriores producen preferentemente metafases. Los tres siguientes los consideraremos como prometafasas, y los dos últimos como profetas.

Fotografía	Célula	Tratamiento
6	203	1 hr. y 1/2 en agua con hielo.
7	292	1 hr. en agua con hielo.
8	286	1/4 de hr. en agua con hielo.
9	285	1 hr. en agua con hielo.
10	215	Sin tratar.

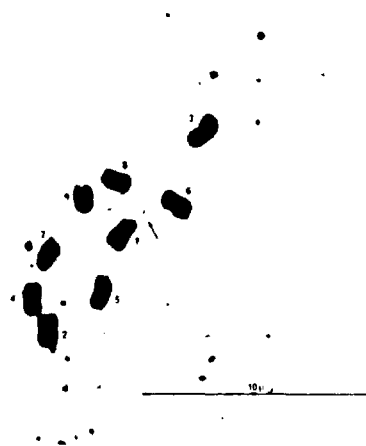
Utilizando las células 209, 210, 205 y 212 realizamos un análisis esta  
dístico similar al del capítulo anterior. Los resultados se muestran en la ta-  
bla VI.

Teniendo en cuenta la poca resolución obtenida con sólo cuatro células,  
intentamos ver como cambiaban los resultados si incluíamos dos de las células  
en prometafase. Estos datos aparecen en la tabla VII.

Las células 285 y 215 que están en estado de profase, serán comentadas  
en la discusión, sus medidas y situación de cromómeros son utilizados en otro  
apartado de estos resultados.

Finalmente en la fotografía 11 se presenta un resumen de las posibili-  
dades que nos ofrecen los diversos estados mitóticos, por comparación de sus as  
pectos cromosómicos.

FOT. 2 Metafase célula 209. Tratamiento 2 horas 3/4 con Oxiquinoleina  
0'002 M.



5 μ



FOT. 3 Metafase célula 210. Tratamiento 2 horas  $1/4$  con oxiquinolaina 0'002 M.

40



1



3



4



2



5



6



7



8

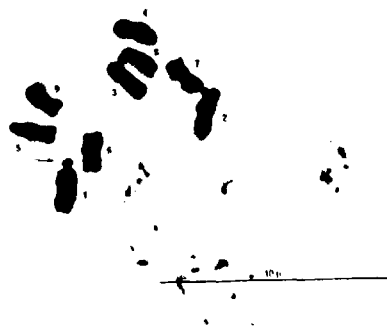


9

41

FOT. 4 Metafase célula 205. Tratamiento 2 horas en agua con hielo.

12



1



3



4



2



5



6



7



8



9

43

FOT. 5 Metafase célula 212. Tratamiento en agua con hielo.

4h



1



3



4



2



5



6



7



8



9

45

FOT. 6 Prometáfase célula 203. Tratamiento 1 hora 1/2 en agua con hielo.

AE



\_\_\_\_\_



1



3



4



2



5



6



7



8



9

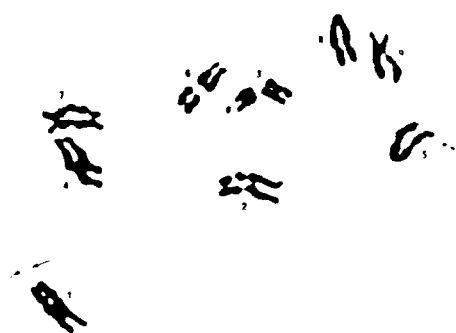
\_\_\_\_\_



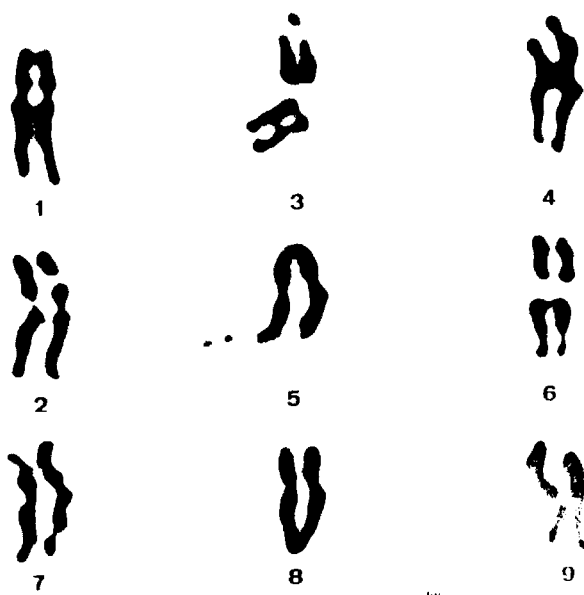
47

FOT. 7 Prometáfase célula 292. Tratamiento 1 hora en agua con hielo.

48



10µ



49

FOT. 8 Prometafase célula 286. Tratamiento 1/4 de hora en agua con hielo.

50



1



3



4



2



5



6



7



8

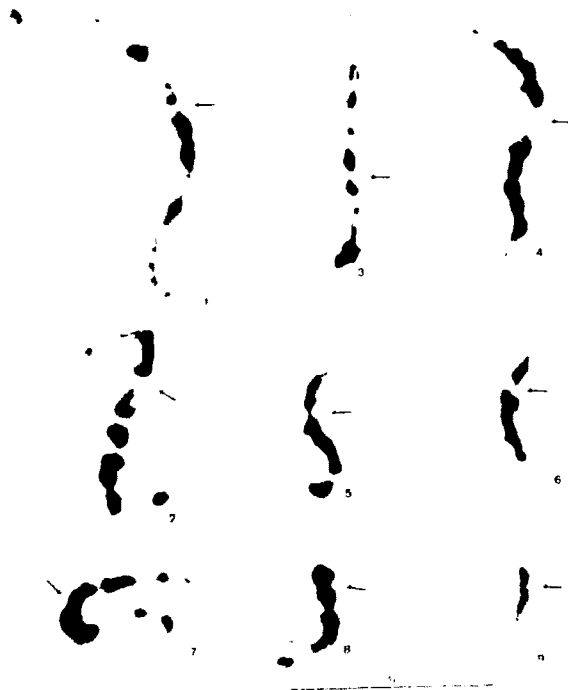
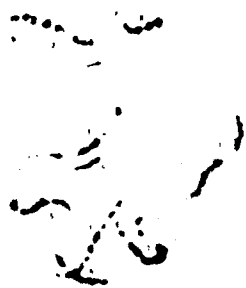


9

54

FOT. 9 Profase célula 285. Tratamiento 1 hora en agua con hielo.

SL



53

FOT. 10 Profese célula 215. Sin tratar.

54

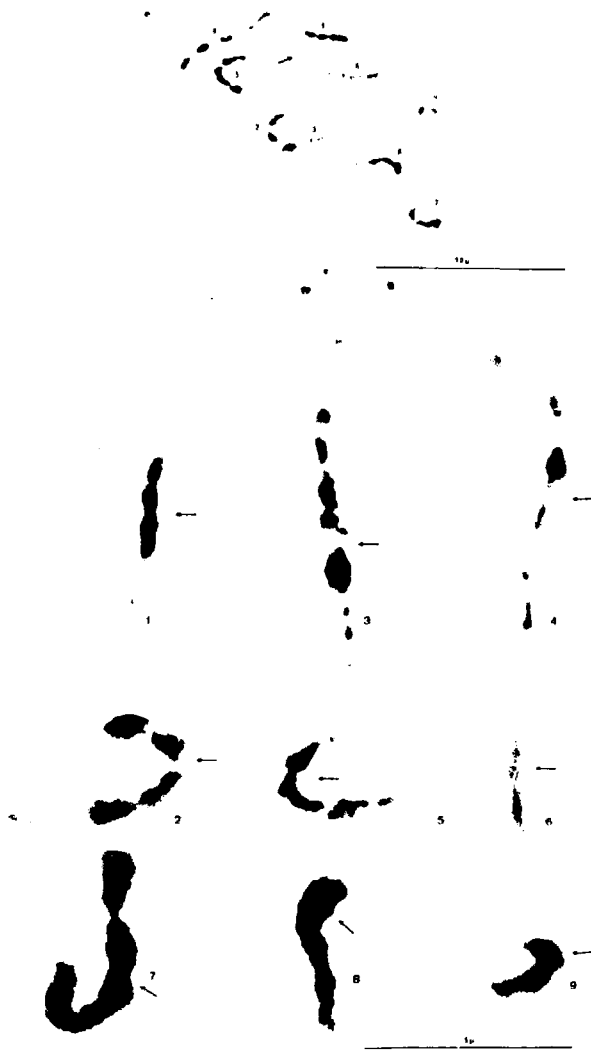




TABLA VI. Análisis de 4 metafases haploides

Cromosomas	L%	L%-Tr.	D.	r	D.	Id.
1	12.10	20.33	ab	2.21	a	61
2	12.93	21.05	a	1.52	c	2-3
3	12.03	20.28	ab	1.15	c	3-2-4
4	11.33	19.65	bc	1.16	c	4-3-6
5	11.00	19.36	cd	2.34	a	5-8
6	10.88	19.25	cd	1.60	bc	6-7-8
7	10.23	18.65	de	1.27	c	7-6
8	10.10	18.50	de	1.98	ab	8-6-9
9	9.40	17.88	e	2.20	a	9-8

F (8,27) para longitudes transformadas, entre cromosomas = 13.68 \*\*

F (8,24) para r, entre cromosomas = 11.36 \*\*

F (3,24) para r, entre células = 1.47 NS

TAOLA VII. Análisis de 4 metafases más 2 prometafases

Cromosoma	L%	L%-Tr.	D.	r	D.	Id.
1	12.12	20.35	ab	2.08	a	S1
2	12.67	20.83	a	1.59	bc	S1
3	11.95	20.22	ab	1.13	d	3-4
4	11.42	19.73	bc	1.13	d	4-3
5	10.97	19.32	cd	2.18	a	S1
6	10.88	19.25	cd	1.51	c	6-7
7	10.42	18.83	de	1.27	cd	7-6
8	10.10	18.50	e	1.89	ab	S1
9	9.43	17.90	f	2.22	a	S1

F (0,45) para longitudes transformadas, entre cromosomas = 20.15 \*\*

F (0,40) para r, entre cromosomas = 14.17 \*\*

F (5,40) para r, entre células = 4.71 \*\*

FOT. 11 Metafases, prometafases y profases en planta haploide.



### 3. Cariotipo prometafásico en diploides

Después de lo observado en células haploides se volvió a trabajar con células diploides, como paso previo al estudio de la serie trisómica. En este apartado incluiremos los estados que se presentan desde el final de la aparición unicomatídica y cromómeros diferenciados, que consideramos profases, hasta el estado de alta condensación estudiado en el apartado 1.

Se comprobó que estos estados aparecían en mayor proporción si no se daba ningún tratamiento a las raíces, o simplemente se les daba un leve golpe de frío.

En la tabla VIII se presenta el análisis estadístico de cinco de estas placas prometafásicas, a las que les hemos unido las dos haploides utilizadas en el apartado anterior, es decir las células 203 y 292.

Las cinco células con sus tratamientos son:

Fotografía	Célula	Tratamiento
12	56	2 hrs. de oxidquinoleína
13	142	Sin tratar
14	175	Sin tratar
	95	Sin tratar
	112	Sin tratar

TABLA VIII. Análisis de 5 prometáfases diploides más dos haploides

Cromosoma	L%	L%-Tr.	D.	r	D.	Id.
1	11.94	20.20	a	2.04	a	81
2	12.23	20.46	a	1.75	bc	81
3	12.23	20.46	a	1.16	d	3-4
4	11.83	20.10	ab	1.18	d	4-3
5	11.03	19.39	bc	1.98	ab	81
6	10.94	19.29	c	1.53	c	81
7	10.40	18.79	cd	1.24	d	81
8	10.03	18.46	d	1.70	c	81
9	9.34	17.77	e	1.97	ab	81

F (8,54) para longitudes transformadas, entre cromosomas = 16.64 \*\*

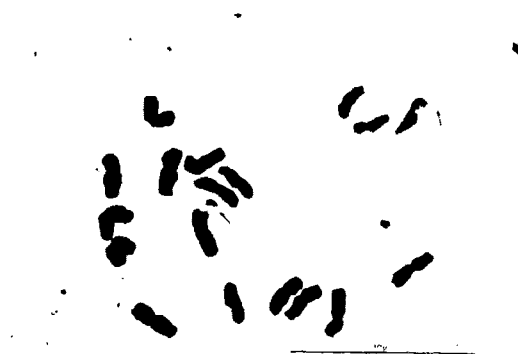
F (8,48) para r, entre cromosomas = 16.47 \*\*

F (6,48) para r, entre células = 2.76 \*

61

FOT. 12 Prometáfase célula 56. Tratamiento 2 horas de Oxiquinoleína.

62



1

3

4



2

5

6



7

8

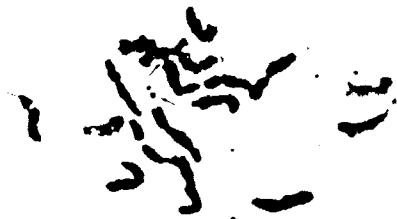
9



61

FOT. 13 Prometafase célula 142. Sin tratar.

6h



1



3



4



2



5



6



7



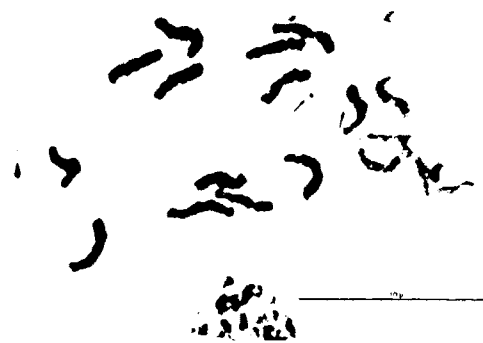
8



9

65

FOT. 14 Prometafase célula 175. Sin tratar.



1

3

4



2

5

6



7

8

9



#### 4. Cariotipo profásico

Al estudiar células haploides en el estado de profase mitótica, se presentó la posibilidad de diferenciar los cromosomas en cuanto a longitud y constitución cromomérica. Se hacía necesario ampliar esta idea a suficientes células, para observar la repetición cromomérica, y sobre todo utilizar células diploides, para comprobar la semejanza entre homólogos.

Se obtuvieron placas en distintos estados de condensación profásica. La mayoría de ellas fueron encontradas en raíces sin tratar o con leve tratamiento de frío. Tres de ellas, 94, 122 y 130 se presentan en las fotografías 15, 16, 17, 18, 19 y 20. Con objeto de estropear lo mínimo posible los cromómeros por culpa del aplastamiento, se aprovecha la profundidad del campo, y por esta razón una misma célula está repetida en distintos enfoques.

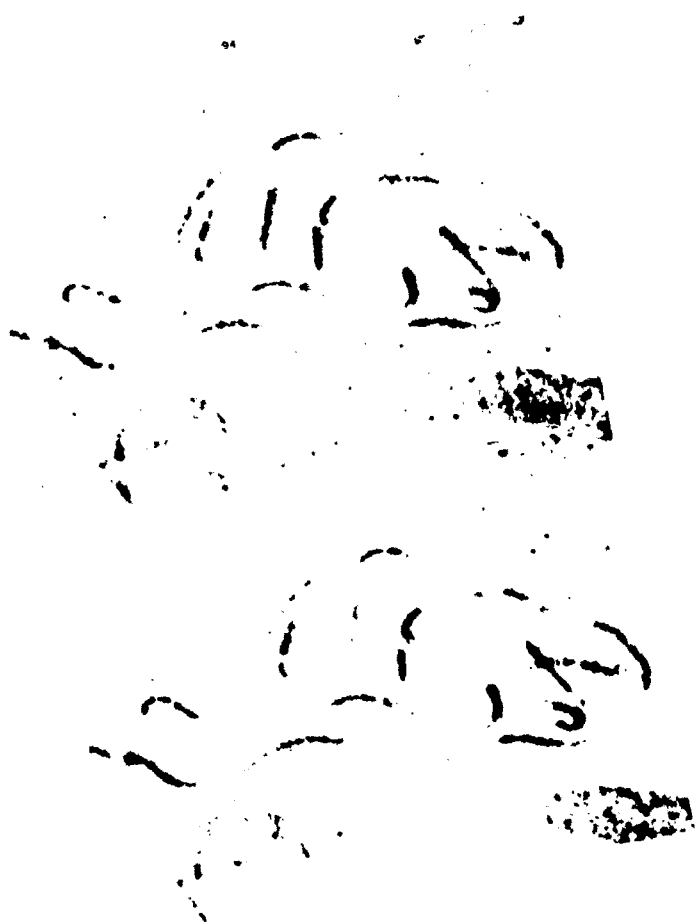
Las otras células utilizadas son las 129, 135, 137, 196, 271, 281 y 282.

En la tabla IX mostramos el análisis similar al que hemos estado utilizando, pero en este caso, tendremos que aceptar un error, debido a no quedar claramente delimitados los extremos de los cromosomas. Serán pues valores orientativos.

68

FOT. 15 Profase, célula 94. Sin tratar.

67





70

FOT. 16 Ordenación cromosómica de la profase, célula 94.

71

94



1



3



4



2



5



6



7



8



9

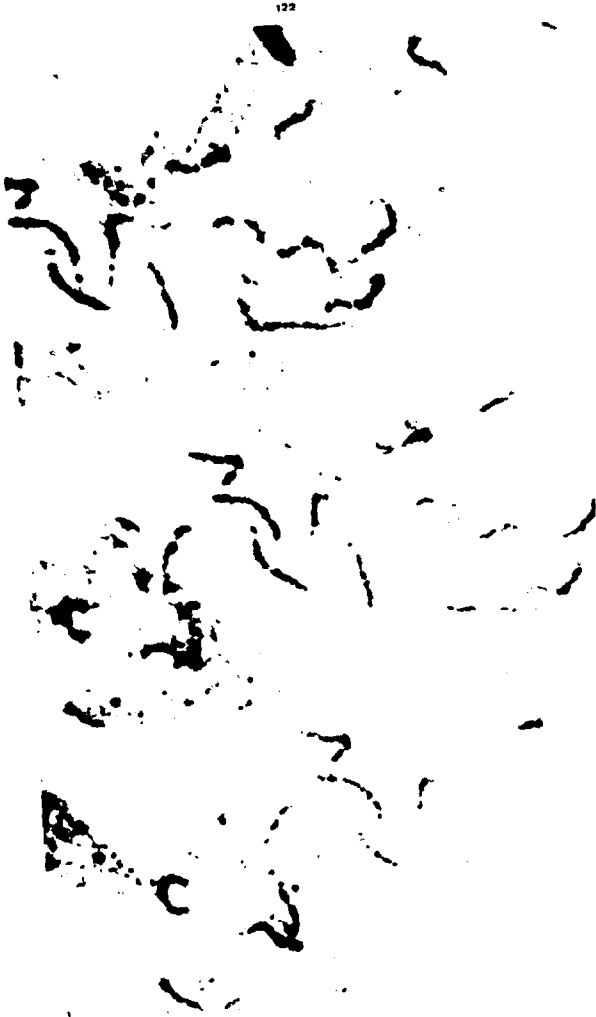
10

12

FOT. 17 Profase, célula 122. Tratamiento 2 horas de agua con hielo.

75

122



FOT. 18 Ordenación cromosómica de la profase, célula 122.

75

122



1



3



4



2



5



6



7



8



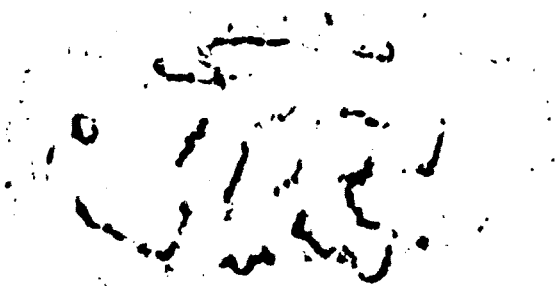
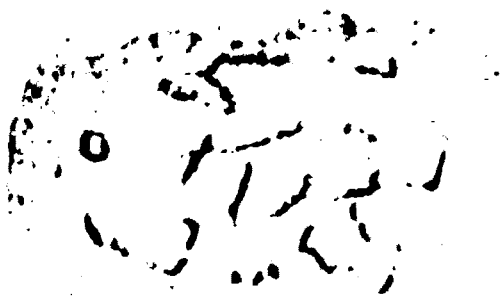
9

—

FOT. 19 Profase, célula 130. Tratamiento dos horas de agua con hielo.

77

130





FOT. 20 Ordenación cromosómica de la profase, célula 130.

29

130



1



3



4



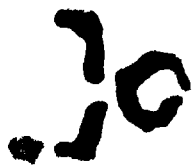
2



5



6



7



8



9

10

TABLA IX. Análisis de 10 células profásicas diploides

Cromosoma	L%	L%-Tr.	D.	r	D.	Id.
1	16.06	23.56	a	1.41	c	61
2	11.20	19.52	cd	1.90	b	2-9
3	12.73	21.03	b	1.10	d	3-4
4	11.65	15.54	bc	1.07	d	4-3
5	10.57	18.57	cde	2.13	a	61
6	9.44	17.88	a	1.86	b	6-9
7	10.01	18.41	de	1.13	d	61
8	8.23	16.61	f	1.66	b	61
9	10.10	18.51	de	1.88	b	9-2-6

F (8,89) para longitudes transformadas, entre cromosomas = 22.62 \*\*\*

F (8,72) para r, entre cromosomas = 24.32 \*\*\*

F (9,72) para r, entre células = 0.93 NS

5. Comparaciones entre metafases, prometafases y profases

Con el empleo de los parámetros de medida ya reseñados, como son  $L\%$  y  $r$ , se ha realizado una comparación de los valores en los tres estados de mitosis estudiados.

Esta comparación se ha realizado basándonos en las 15 células metafásicas, 7 prometafásicas y 10 profásicas reseñadas en apartados anteriores, comparándose los valores medios a través de la  $t$  de Student.

En las tablas X y XI se presentan los resultados de dicho análisis.

TABLA X. Comparaciones de r.

<u>Cr.</u>	<u>Profese</u>		<u>Prometafase</u>		<u>Metafase</u>
1	1,41	t=3,95**	2,04	t=3,00**	1,68
	-----		t=2,74*	-----	
2	1,90	t=1,43	1,75	t=2,92**	1,50
	-----		t=5,04**	-----	
3	1,10	t=1,02	1,16	t=1,63	1,23
	-----		t=3,40**	-----	
4	1,07	t=1,89	1,18	t=0,54	1,15
	-----		t=2,40*	-----	
5	2,13	t=1,17	1,98	t=2,69*	1,69
	-----		t=5,88**	-----	
6	1,86	t=2,26*	1,53	t=1,59	1,40
	-----		t=4,93**	-----	
7	1,13	t=1,89	1,24	t=2,63*	1,13
	-----		t=0,05	-----	
8	1,66	t=0,32	1,70	t=3,21**	1,50
	-----		t=1,62	-----	
9	1,88	t=0,46	1,97	t=1,36	1,79
	-----		t=0,68	-----	

TABLA XI. Comparaciones de  $t_x$ .

Cl.	Profase			Prometafase			Metafase		
	%	$T_r$		%	$T_r$		%	$T_r$	
1	16,06	23,7	$t=4,30^{**}$	11,94	20,2	$t=0,08$	11,93	20,2	
					$t=6,67^{**}$				
2	11,20	19,6	$t=1,91$	12,23	20,4	$t=1,48$	12,60	20,8	
					$t=3,78^{**}$				
3	12,23	20,9	$t=1,14$	12,23	20,4	$t=0,90$	11,97	20,3	
					$t=2,32^*$				
4	11,65	20,0	$t=0,38$	11,83	20,1	$t=2,07$	11,40	19,7	
					$t=0,72$				
5	10,57	19,0	$t=1,21$	11,03	19,4	$t=0,15$	11,05	19,4	
					$t=1,77$				
6	9,44	17,9	$t=3,38^{**}$	10,94	19,3	$t=0,41$	10,82	19,2	
					$t=4,83^{**}$				
7	10,01	18,4	$t=0,66$	10,40	18,8	$t=0,85$	10,55	18,9	
					$t=1,37$				
8	8,23	16,6	$t=2,77^*$	10,03	18,4	$t=0,15$	10,06	18,5	
					$t=4,23^{**}$				
9	10,10	18,5	$t=1,27$	9,34	17,8	$t=1,14$	9,60	18,0	
					$t=1,25$				

	$G.L.$	$t_{r,0,01}$	$t_{r,0,05}$
PROFASE - PROMETAFASE	15	2,947	2,131
METAFASE - PROFASE	23	2,807	2,069
METAFASE - PROMETAFASE	20	2,845	2,086

#### 6. Estudio de la contracción del cromosoma

Se presentan a continuación las fotografías 21 a 29 en las cuales pueden observarse los cromosomas 1 al 9 respectivamente, en diferentes estados de contracción profásica, prometáfásica y metafásica. Los cromosomas que se muestran pertenecen a las mismas células tal como puede apreciarse por el número que llevan.

En un intento de definir el modo de producirse la contracción cromosómica, hemos elegido dos cromómeros representativos de cada uno de los brazos cromosómicos, midiendo en cada caso la distancia comprendida entre el centrómero y el punto medio de cada cromómero en estudio. Este trabajo se ha realizado con 7 células elegidas, que fueron las 203, 142, 122, 198, 271, 281 y 282.

Como forma alternativa, que luego discutiremos, de intentar caracterizar biométricamente el proceso de condensación cromosómica, se ha decidido utilizar como parámetro representador de tiempo de profase, la longitud del complemento cromosómico. De esta forma se ha representado en abscisas la citada longitud total del complemento cromosómico de la célula, y en ordenadas las ya referidas distancias de centrómero a punto medio de cromómero en estudio.

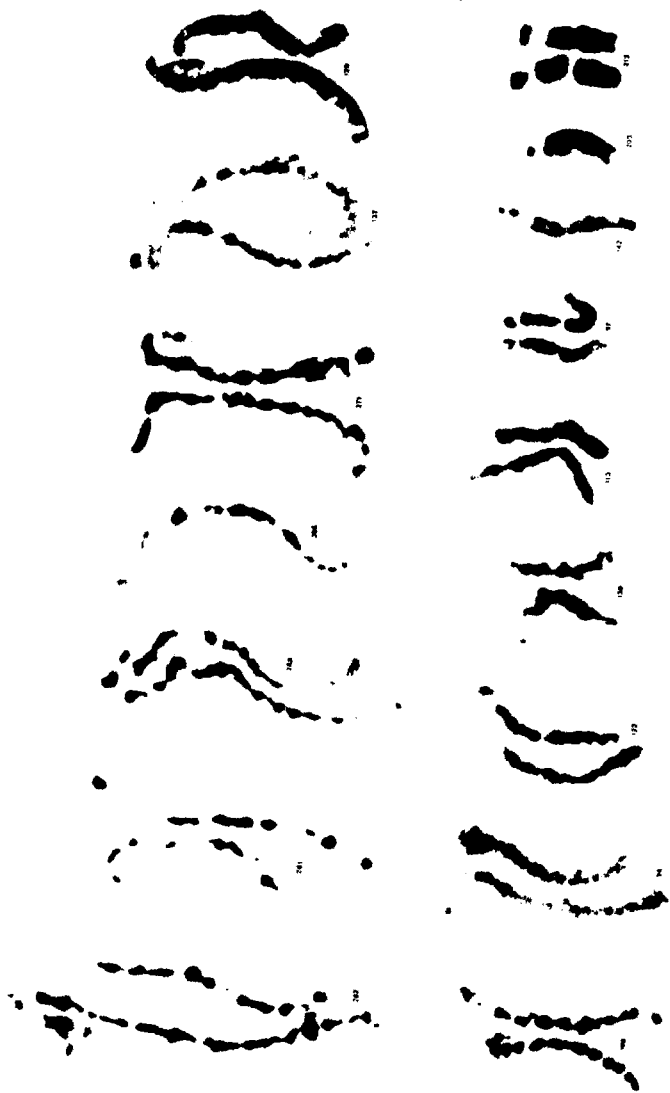
A partir de estos datos se calcularon para cada cromómero los valores  $a$  y  $b$  definitorios de la curva así como el coeficiente de determinación de la misma. Estos valores referidos a ajustes lineales, exponenciales y logarítmicos se presentan en la tabla XII, en la que los cromómeros quedan identificados por:

- CL brazo corto, cromómero alejado.
- CC brazo corto, cromómero cercano.
- LC brazo largo, cromómero cercano.
- LL brazo largo, cromómero alejado.

Basándonos en el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) máximo para cada ca  
so, se ha elegido el tipo de curva que mejor ajusta, incluyéndose en las gráfi  
cas 1 a 9 la evolución de los segmentos cromosómicos estudiados.



FOT. 21 Cromosoma número 1. Diferentes estados de condensación.



FOT. 22 Cromosoma número 2. Diferentes estados de condensación.

١٠  
 ١١  
 ١٢  
 ١٣  
 ١٤

١٥  
 ١٦  
 ١٧  
 ١٨  
 ١٩

91

FDT, 23 Cromosoma número 3. Diferentes estados de condensación.

ك

ك

ك

ك

ك

ك

ك

ك

ك

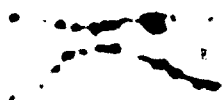
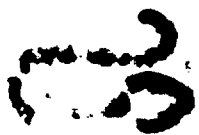
ك

ك

ك

FOT. 24 Cromosoma número 4. Diferentes estados de condensación.

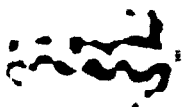
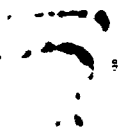
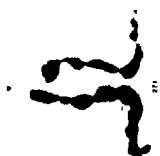
۹۶



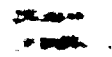
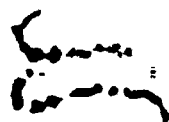


95

FOT. 25 Cromosoma número 5. Diferentes estados de condensación.



FOT. 26 Cromosoma número 6. Diferentes estados de condensación.



FOT. 27 Cromosoma número 7. Diferentes estados de condensación.

۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰

۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰  
۱۰۰

101

FOT. 28 Cromosoma número 8. Diferentes estados de condensación.

ۛ  
 ۛ  
 ۛ  
 ۛ  
 ۛ  
 ۛ

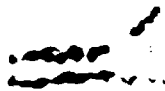
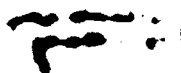
ۛ  
 ۛ  
 ۛ  
 ۛ  
 ۛ  
 ۛ



103

FOT. 29 Cromosoma número 9. Diferentes estados de condensación.

104

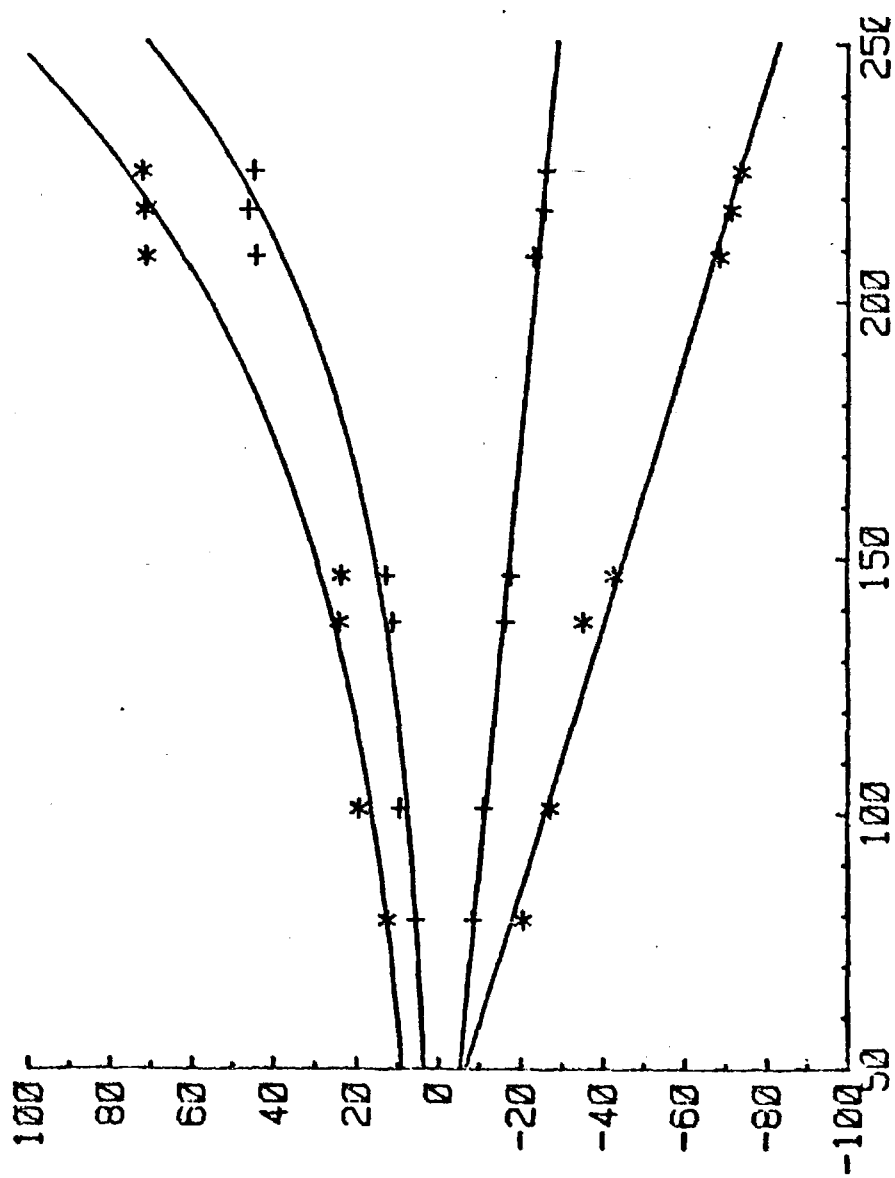


TADLA XII. CONTRACCION DE PROFASES

		EXPON.			LIN.			LOG.		
		R <sup>2</sup>	a	b	R <sup>2</sup>	a	b	R <sup>2</sup>	a	b
1	CL	0'97	4'80	0'01	0'93	-30'55	0'46	0'86	-274'69	63'31
	CC	0'97	1'73	0'01	0'92	-24'72	0'31	0'84	-191'15	43'20
	LC	0'98	5'38	0'01	0'99	- 0'56	0'12	0'98	- 66'68	16'96
	LL	0'99	10'89	0'01	0'99	-12'40	0'38	0'94	-221'72	53'98
2	CL	0'97	10'07	0'01	0'92	- 3'59	0'24	0'85	-129'18	32'58
	CC	0'98	5'01	0'01	0'96	0'39	0'09	0'89	- 47'32	12'35
	LC	0'90	4'31	0'01	0'86	- 5'79	0'16	0'82	- 95'58	23'17
	LL	0'91	11'21	0'01	0'88	- 7'40	0'32	0'83	-181'78	45'01
3	CL	0'90	11'01	0'01	0'94	2'88	0'19	0'96	-103'56	27'20
	CC	0'94	4'74	0'01	0'92	0'59	0'08	0'86	- 43'23	11'34
	LC	0'96	3'16	0'01	0'96	- 0'20	0'06	0'92	- 36'03	9'23
	LL	0'88	13'05	4'4E-3	0'90	9'72	0'11	0'93	- 53'27	16'05
4	CL	0'99	8'38	0'01	0'98	-11'74	0'32	0'93	-187'07	45'24
	CC	0'99	4'18	0'01	0'97	- 3'08	0'12	0'92	- 69'71	17'21
	LC	0'92	4'29	0'01	0'95	- 7'44	0'20	0'93	-118'19	28'35
	LL	0'95	9'34	0'01	0'97	- 7'81	0'30	0'95	-175'30	43'03
5	CL	0'95	6'57	0'01	0'99	- 4'14	0'20	0'98	-113'55	28'08
	CC	0'98	2'61	0'01	0'94	- 5'59	0'12	0'86	- 70'19	16'74
	LC	0'81	7'62	0'01	0'91	3'97	0'10	0'95	- 56'18	15'32
	LL	0'95	15'99	0'01	0'98	5'05	0'23	0'98	-126'01	33'80
6	CL	0'95	7'79	0'01	0'93	1'14	0'13	0'86	- 67'95	17'91
	CC	0'98	3'86	0'01	0'97	0 0'43	0'07	0'93	- 37'18	9'70
	LC	0'95	2'32	0'01	0'89	- 3'69	0'09	0'81	- 51'05	12'31
	LL	0'97	9'81	0'01	0'96	- 0'33	0'20	0'92	-107'66	27'66
7	CL	0'95	7'44	0'01	0'98	- 1'53	0'18	0'98	-100'51	25'38
	CC	0'95	2'57	0'01	0'98	- 4'01	0'11	0'96	- 64'20	15'47
	LC	0'88	5'78	0'01	0'96	0'68	0'11	0'97	- 62'28	16'11
	LL	0'94	12'07	0'01	0'98	6'06	0'15	0'99	- 79'51	21'90
8	CL	1'00	7'65	0'01	0'99	- 1'40	0'17	0'94	- 93'25	23'69
	CC	0'97	4'05	0'01	0'96	- 2'20	0'11	0'90	- 61'04	15'20
	LC	0'88	4'49	0'01	0'91	1'40	0'07	0'91	- 39'15	10'38
	LL	0'86	11'90	0'01	0'91	4'99	0'18	0'55	- 53'72	26'40
9	CL	0'97	4'49	0'01	0'98	- 6'85	0'18	0'94	-103'02	26'03
	CC	0'94	1'73	0'01	0'97	- 4'97	0'10	0'94	- 61'89	14'64
	LC	0'99	2'68	0'01	0'96	- 8'70	0'16	0'91	- 96'91	22'79
	LL	1'00	10'06	0'01	0'97	- 7'94	0'30	0'91	-169'77	41'84

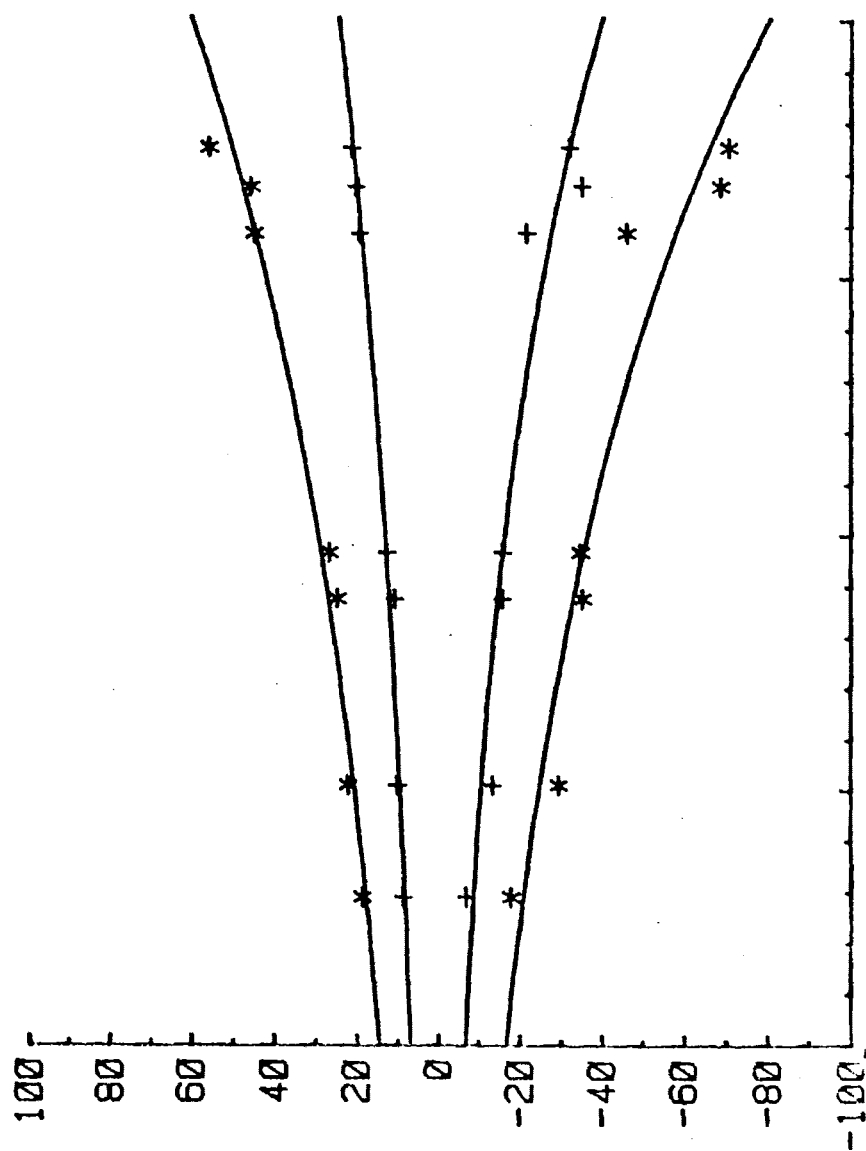
# CROMOSOMA 1

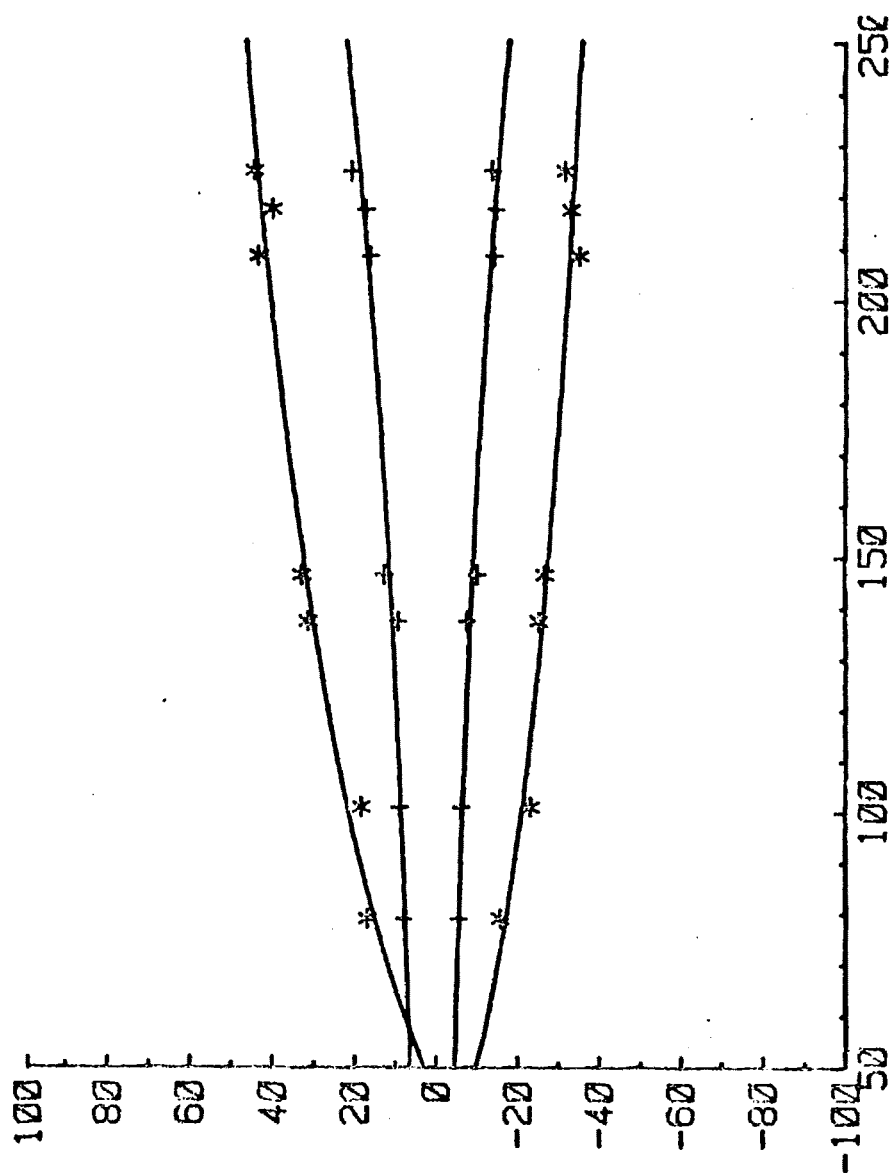
- 106 -



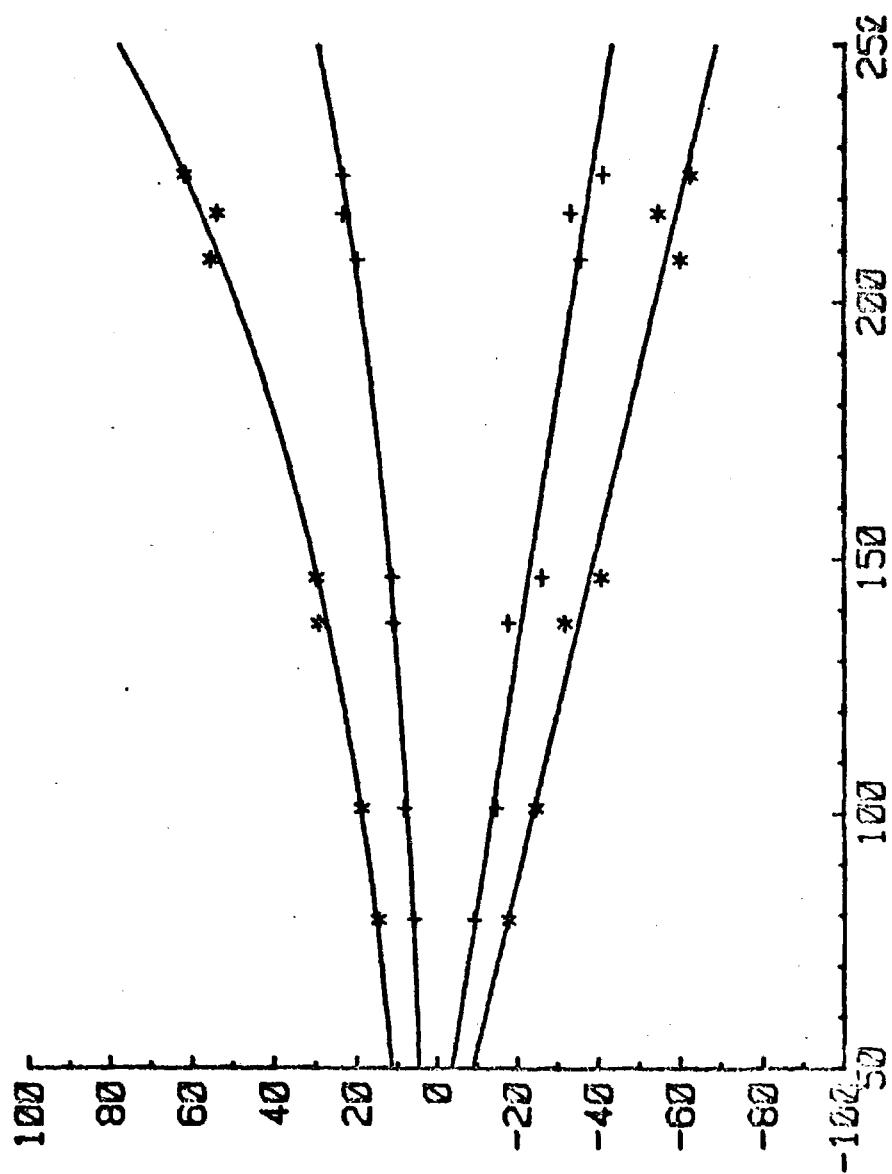
# CROMOSOMA 2

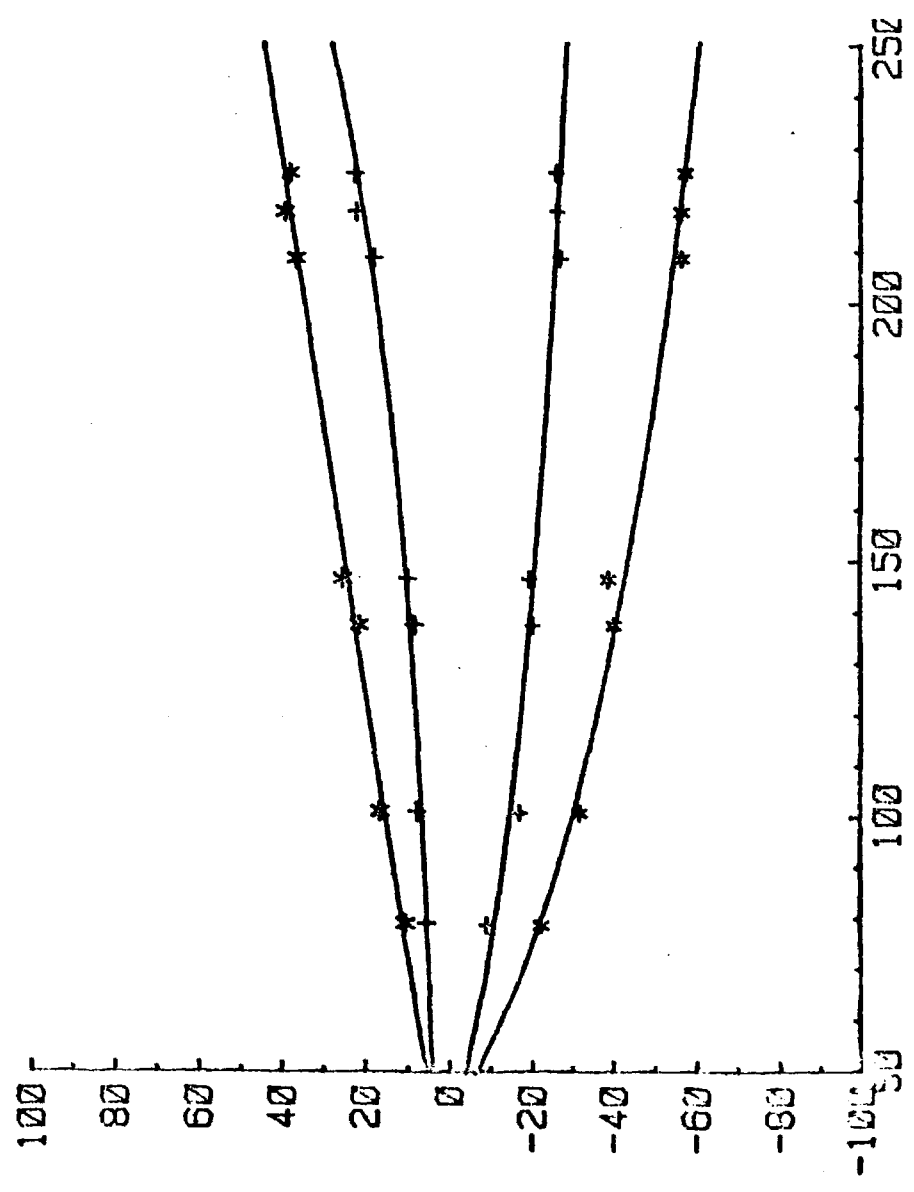
- 107 -





# CROMOSOMA 4



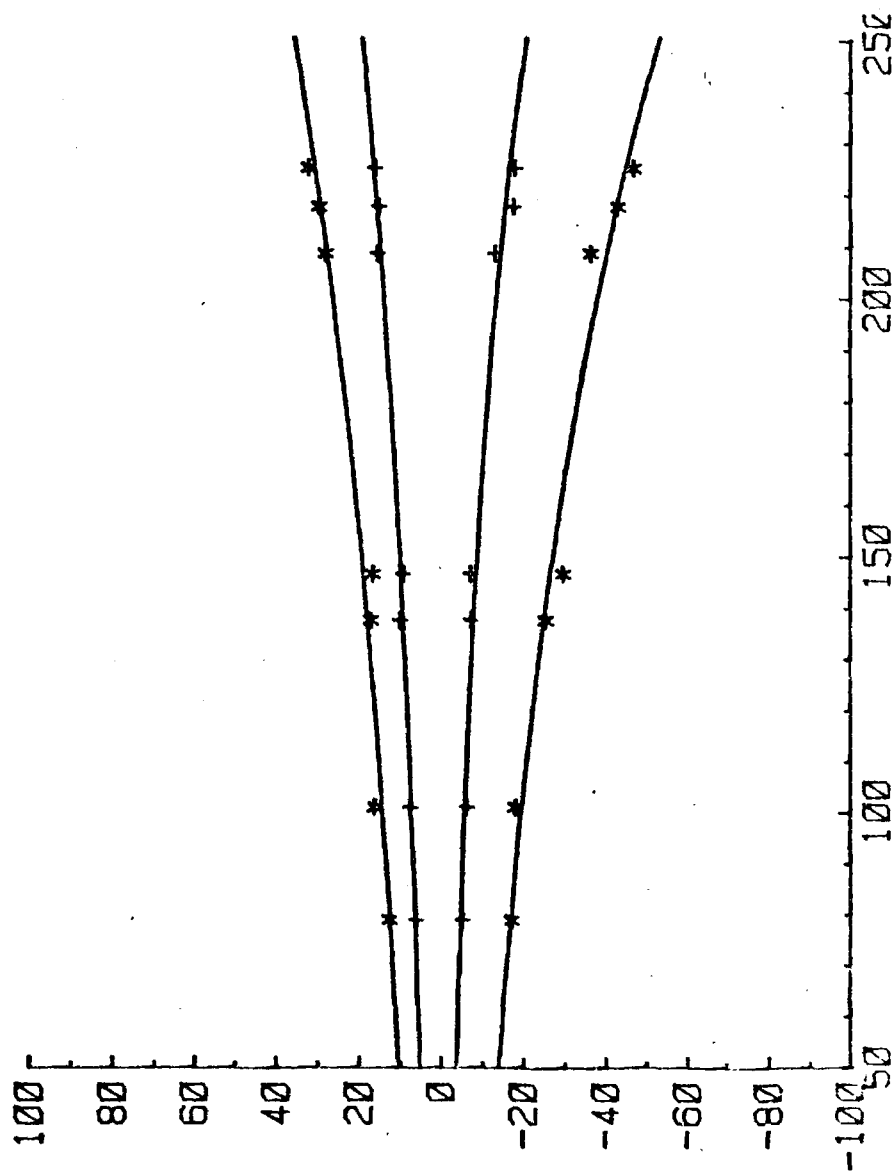




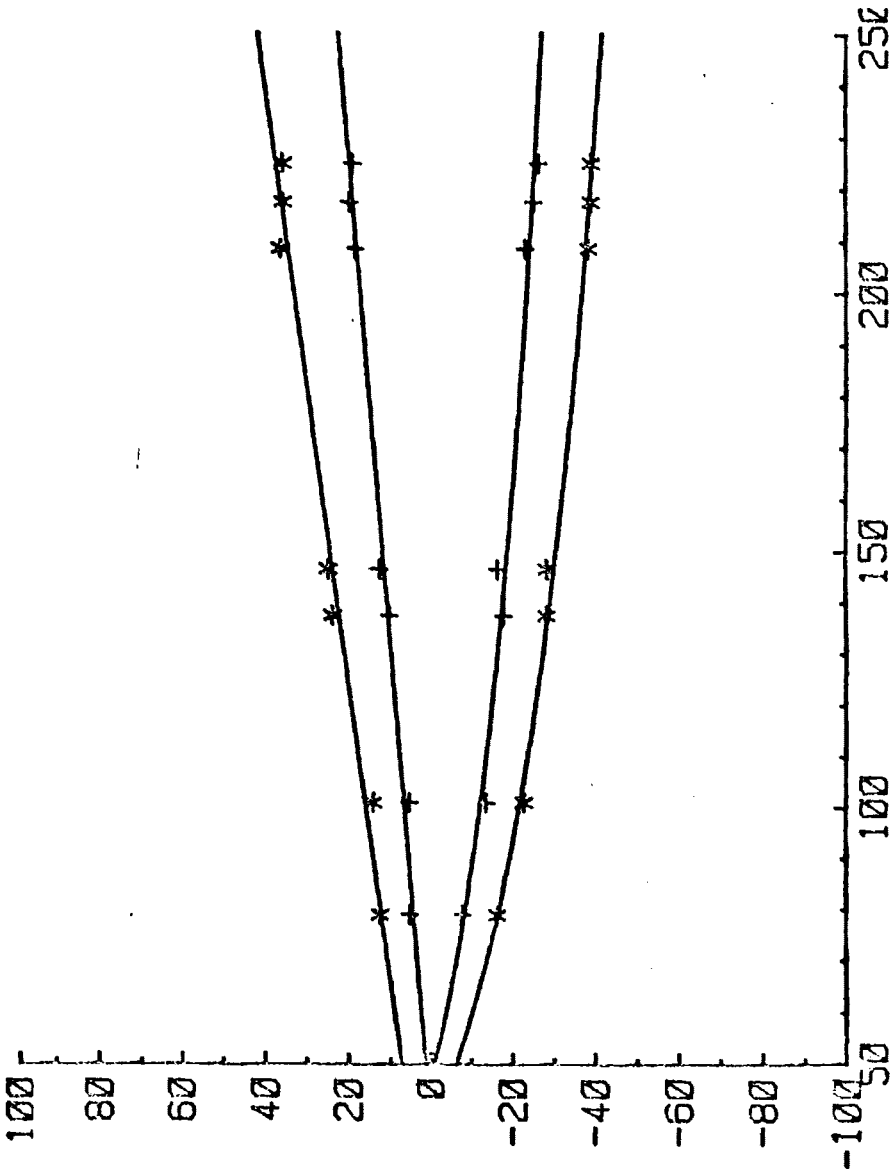


BIBLIOTECA

## CROMOSOMA 6

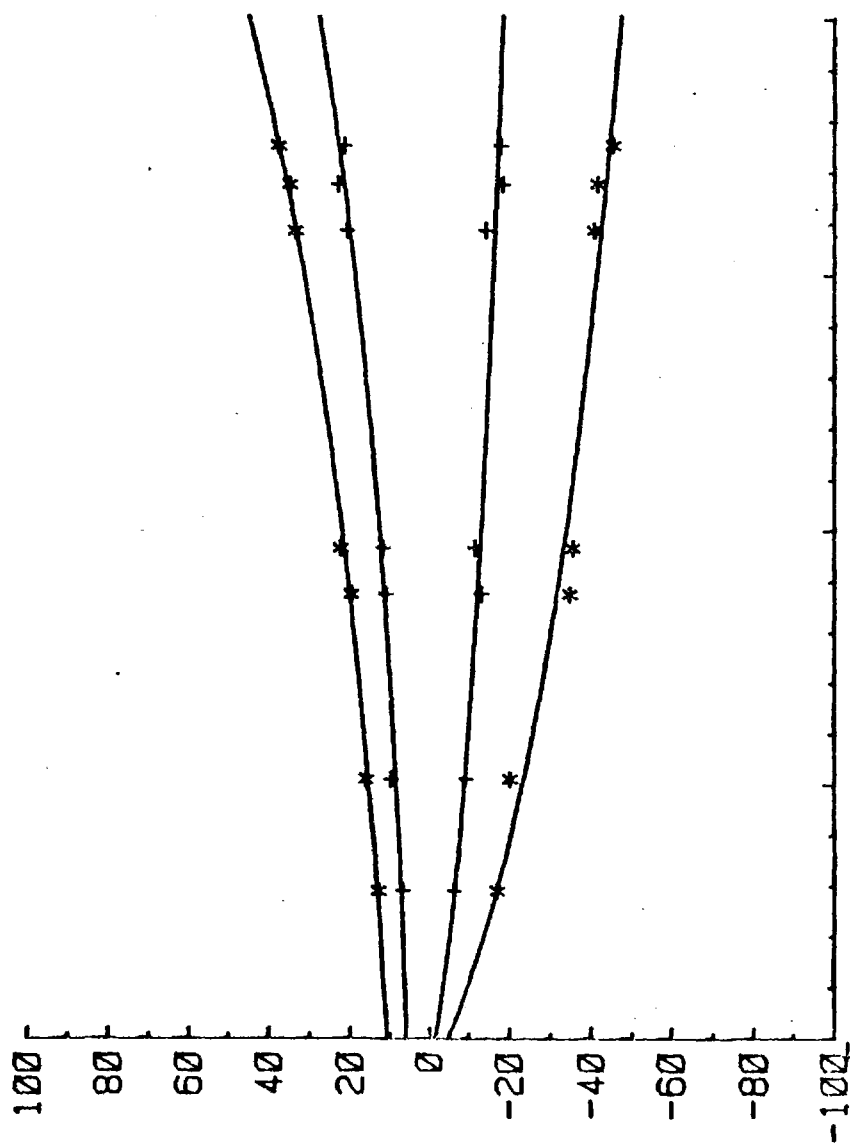


CROMOSOMA 7



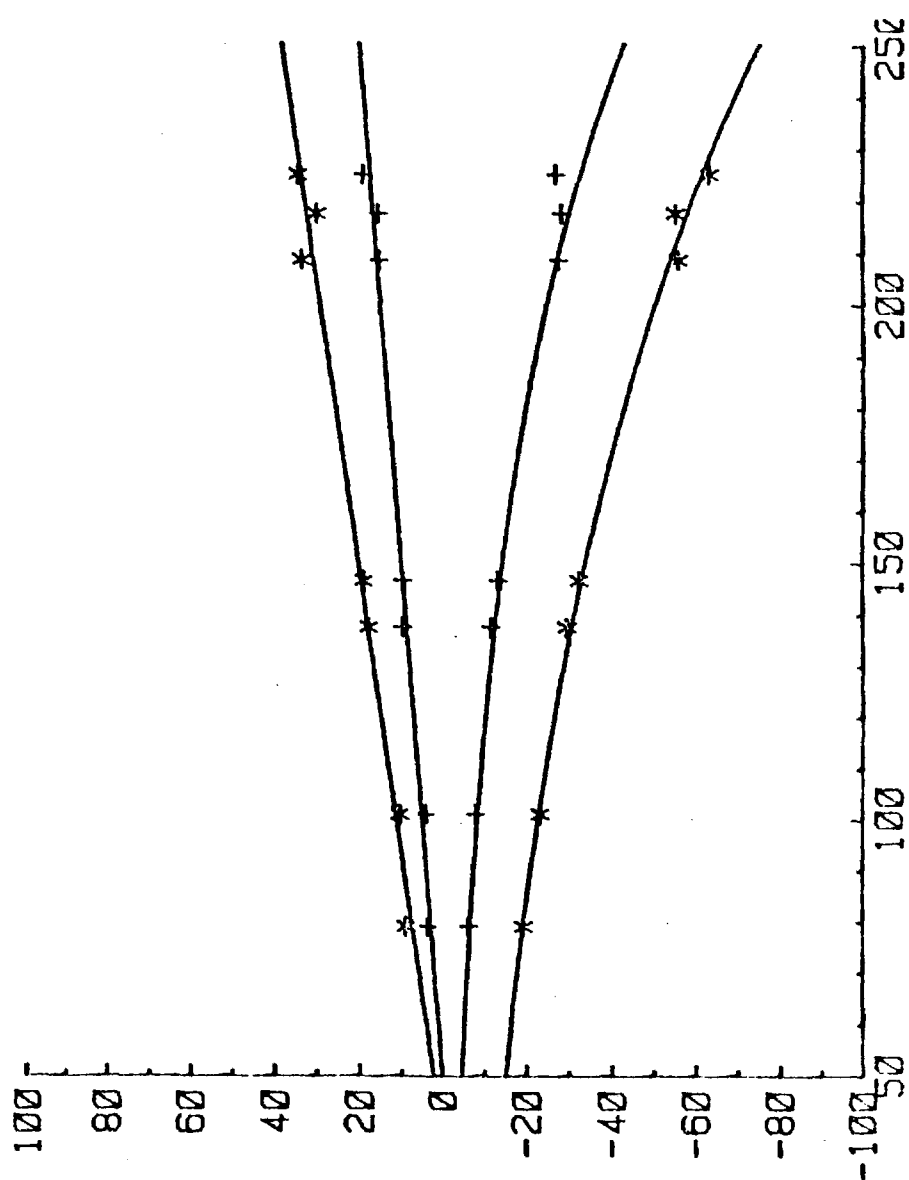
# CROMOSOMA 8

- 113 -



# CROMOSOMA 9

- 114 -



7. Identificación positiva de la serie trisómica

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la identificación de los diferentes tipos trisómicos.

- a. Trisómico tipo 1.- En las tablas XIII y XIV se presentan los resultados numéricos de la prometafase 220E y de la profase 276E, cuyos cariotipos pueden observarse en las fotografías 30 y 31.
- b. Trisómico tipo 2.- En las tablas XV y XVI se presentan los resultados numéricos de la prometafase 214B y de la profase 281B, cuyos cariotipos pueden observarse en las fotografías 32 y 33.
- c. Trisómico tipo 3.- En las tablas XVII y XVIII se presentan los resultados numéricos de la prometafase 231D y de la profase 271D, cuyos cariotipos pueden observarse en las fotografías 34 y 35.
- d. Trisómico tipo 4.- En las tablas XIX y XX se presentan los resultados numéricos de la prometafase 233C y de la profase 240C, cuyos cariotipos pueden observarse en las fotografías 36 y 37.
- e. Trisómico tipo 5.- En la tabla XXI se presentan los resultados numéricos de la prometafase 256F, cuyo cariotipo puede observarse en la fotografía 38.
- f. Trisómico tipo 6.- En la tabla XXII se presentan los resultados numéricos de la prometafase 269A, cuyo cariotipo puede observarse en la fotografía 39, correspondientes a un tetrasómico 6.
- g. Trisómico tipo 7.- En la tabla XXIII se presentan los resultados numéricos de la metafase 284G, cuyo cariotipo puede observarse en la

fotografía 40.

h. Trisómico tipo 8.— En la tabla XXIV se presentan los resultados numéricos de la prometafase 274H, cuyo cariotipo puede observarse en la fotografía 41.

i. Trisómico tipo 9.— En la tabla XXV se presentan los resultados numéricos de la metafase 267I, cuyo cariotipo puede observarse en la fotografía 42.

FOT. 30 Cariotipo prometafásico de la célula 220 E. Tratamiento 2 horas  
en agua con hielo.



1

3

4



2

5

6



7

8

9



TABLA XIII. Trisómico tipo 1. Prometafase 220E

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	11'60	1'50		
	12'29	1'52		
	12'29	1'59	1'54	12'06
2	11'60	1'33		
	11'37	1'39	1'36	11'49
3	12'06	1'08		
	12'06	1'17	1'13	12'06
4	12'06	1'17		
	12'06	1'08	1'13	12'06
5	11'02	1'79		
	10'67	1'88	1'84	10'85
6	11'37	1'51		
	11'13	1'53	1'52	11'25
7	10'21	1'20		
	10'44	1'14	1'17	10'33
8	10'44	1'50		
	10'55	1'46	1'48	10'50
9	8'81	2'17		
	9'97	1'87	2'02	9'39

120

FOT. 31 Cariotipo profásico de la célula 276 E. Tratamiento 15 minutos en agua  
con hielo.

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

1

3

4

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

2

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

5

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

6

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

7

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

8

Handwritten text in a cursive script, possibly a signature or a short phrase.

9

TABLA XIV. Trisómico tipo 1. Profase 276 E

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	13'01	2'00		
	11'83	2'00		
	12'49	2'17	2'06	12'71
2	11'18	1'83		
	12'49	1'71	1'77	11'84
3	17'25	1'08		
	17'09	1'00	1'04	17'42
4	9'86	1'14		
	12'49	1'11	1'13	11'18
5	9'53	2'22		
	9'20	1'80	2'01	9'37
6	11'18	1'43		
	10'52	1'29	1'36	10'85
7	12'49	1'11		
	9'86	1'14	1'13	11'18
8	8'55	1'60		
	9'20	1'80	1'70	8'88
9	5'92	2'00		
	7'23	1'75	1'89	6'58

123

FOT. 32 Cariotipo prometafásico de la célula 214 B. Tratamiento  
2 horas en agua con hielo.

12A

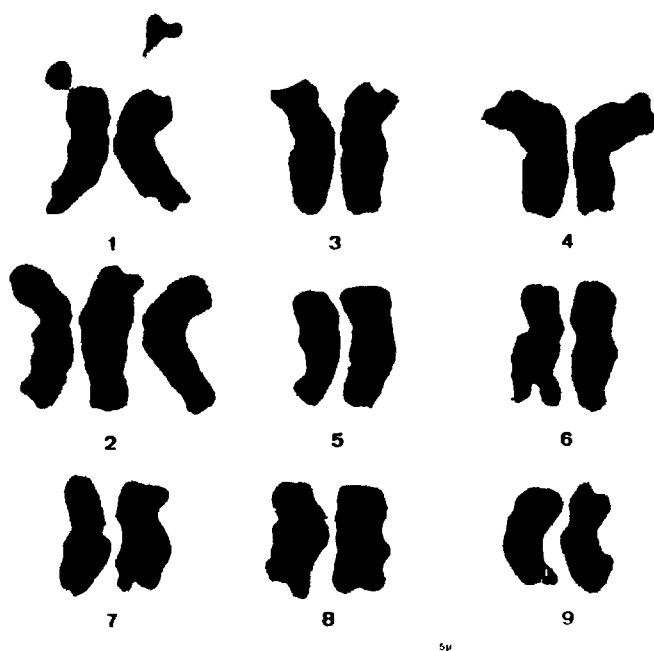


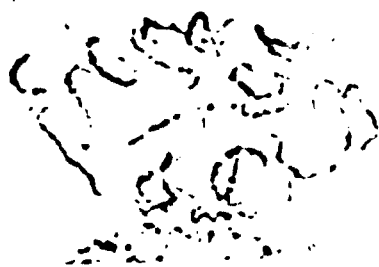
TABLA XV. Trisómico tipo 2. Prometáfase 214B.

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	11'65	1'89		
	11'10	1'76	1'83	11'38
2	13'60	1'50		
	13'50	1'38		
	13'82	1'44	1'44	13'64
3	12'08	1'06		
	11'75	1'08	1'07	11'92
4	11'97	1'00		
	12'19	1'00	1'00	12'07
5	10'88	2'33		
	11'10	2'19	1'26	10'99
6	10'67	1'58		
	11'10	1'55	1'57	10'88
7	10'77	1'20		
	10'23	1'24	1'22	10'51
8	9'03	1'86		
	9'14	1'80	1'83	9'09
9	9'36	2'31		
	9'69	2'18	2'25	9'53

126

FOT. 33 Cariotipo profásico de la célula 281 B. Tratamiento 15 minutos en agua  
con hielo.





2	3	4
5	6	7
8	9	10

TABLA XVI. Trisómico tipo 2. Profase 281B.

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	18'39	1'50		
	19'31	1'33	1'42	10'85
2	10'12	1'20		
	10'58	1'42		
	10'58	1'30	1'31	10'43
3	12'42	1'08		
	13'34	1'07	1'08	12'88
4	11'04	1'18		
	10'12	1'20	1'19	10'58
5	10'58	1'88		
	10'12	1'75	1'82	10'35
6	11'96	1'36		
	11'04	1'40	1'38	11'50
7	11'50	1'08		
	9'66	1'10	1'09	10'58
8	6'50	1'14		
	7'17	1'36	1'25	7'04
9	7'82	1'83		
	7'82	1'43	1'63	7'82

129

FOT. 34 Cariotipo prometafásico de la célula 231 D. Tratamiento 2 horas en agua  
con hielo.

150

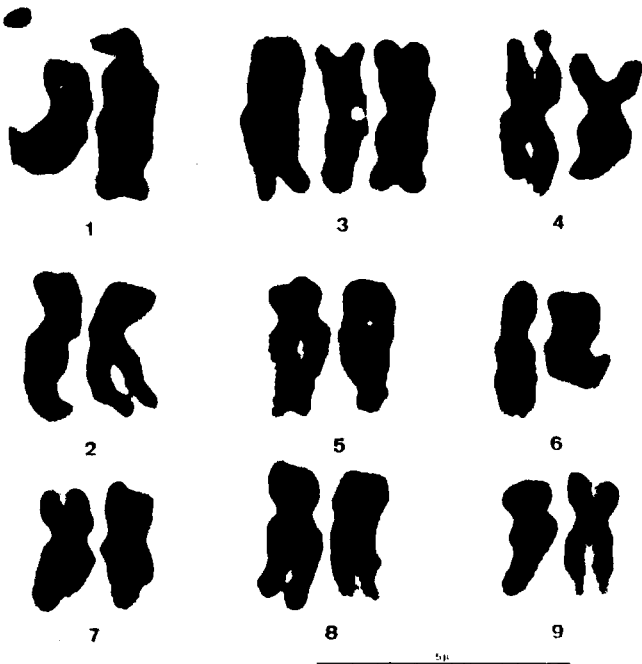
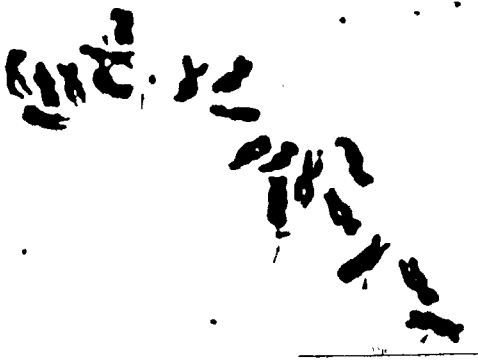
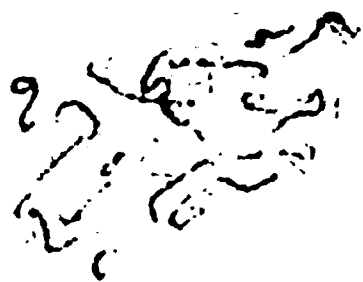


TABLA XVII. Irisómico tipo 3. Prometafase 2310

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	11'00	1'59		
	10'61	1'75	1'67	10'81
2	12'73	1'54		
	11'48	1'53	1'54	12'11
3	13'12	1'27		
	12'36	1'21		
	12'54	1'17	1'22	12'67
4	11'19	1'15		
	11'28	1'13	1'14	11'24
5	11'09	2'48		
	11'19	2'22	2'36	11'14
6	11'00	1'59		
	10'80	1'67	1'63	10'90
7	11'00	1'38		
	9'84	1'43	1'41	10'42
8	11'19	1'76		
	10'61	1'75	1'76	10'90
9	10'03	2'71		
	9'65	2'33	2'52	9'84

433

FOI. 35 Cariotipo profásico de la célula 271 D. Sin tratar.



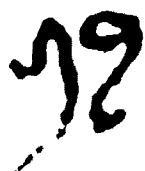
1



3



4



2



5



6



7



8



9

TABLA XVIII. Trisómico tipo 3. Profase 271D

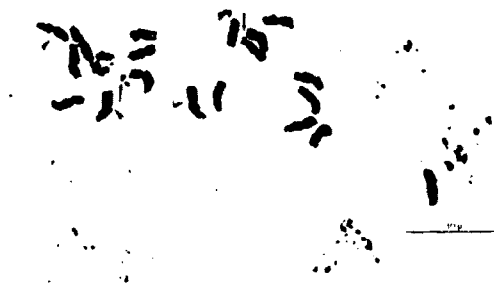
Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	18'48	1'23		
	18'20	1'25	1'24	18'34
2	11'49	1'78		
	11'95	1'60	1'69	11'72
3	12'60	1'21		
	13'33	1'23		
	12'87	1'15	1'20	12'93
4	10'57	1'09		
	10'57	1'09	1'09	10'57
5	10'26	2'16		
	10'39	2'23	2'20	10'58
6	7'81	1'43		
	8'27	1'57	1'50	8'04
7	7'81	1'13		
	10'11	1'20	1'17	8'96
8	7'81	1'43		
	7'35	1'67	1'55	7'58
9	11'03	2'00		
	11'49	2'13	2'07	11'26



136

FOT. 36 Cariotipo prometáfase de la célula 233 C. Tratamiento 2 horas en agua  
con hielo.

13f



1



3



4



2



5



6



7



8



9

5μ

TABLA XIX. Trisómico tipo 4. Prometafase 233C

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	11'12	2'00		
	10'85	2'04	2'02	10'99
2	12'77	1'58		
	12'77	1'45	1'52	12'77
3	12'08	1'20		
	12'22	1'23	1'22	12'15
4	12'08	1'10		
	11'94	1'07		
	11'94	1'12	1'10	11'99
5	11'67	1'74		
	11'26	1'73	1'74	11'47
6	11'53	1'55		
	11'53	1'47	1'51	11'53
7	10'57	1'03		
	10'85	1'03	1'03	10'71
8	8'92	1'32		
	8'92	1'41	1'37	8'92
9	9'34	2'09		
	9'61	1'92	2'01	9'48

139

FOT. 37 Cariotipo profásico de la célula 240 C. Tratamiento 2 horas en agua con  
hielo.

140



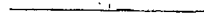
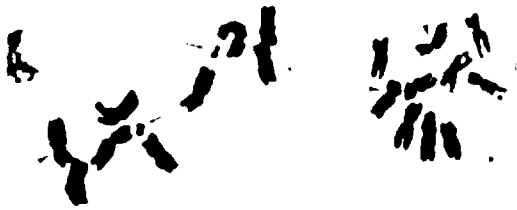
TABLA XX. Trisómico tipo 4. Profase 240C

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	14'16	2'18	.	
	15'38	2'17	2'18	14'77
2	12'30	1'92		
	13'26	1'83	1'88	13'03
3	12'79	1'08		
	13'43	1'08	1'08	13'11
4	11'98	1'18		
	12'30	1'17		
	12'63	1'23	1'19	12'30
5	10'20	2'15		
	10'20	2'50	2'33	10'20
6	12'14	1'50		
	12'14	1'50	1'50	12'14
7	8'54	1'12		
	7'45	1'00	1'06	8'00
8	8'90	1'62		
	9'23	1'59	1'61	9'07
9	7'77	1'67		
	6'96	1'87	1'77	7'37

142

FOT. 38 Cariotipo prometafásico de la célula 256 F. Tratamiento 2 horas en agua  
con hielo.

143



1



1



3



4



2



5



6



7



8



9

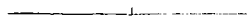




TABLA XXI. Trisómico tipo 5. Prometáfase 256 F

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	12'99	1'50	1'55	12'93
	12'87	1'60		
2	12'37	1'27	1'30	12'25
	12'12	1'33		
3	12'37	1'22	1'18	12'50
	12'62	1'13		
4	11'01	1'02	1'06	10'95
	10'89	1'10		
5	10'39	2'00	1'94	10'68
	10'89	1'93		
	10'76	1'90		
6	10'52	1'66	1'64	10'58
	10'64	1'61		
7	10'64	1'05	1'09	10'58
	10'52	1'13		
8	9'90	1'67	1'67	10'09
	10'27	1'68		
9	9'28	1'68	1'64	9'47
	9'65	1'60		

145

FOT. 39 Cariotipo prometáfico de la célula 269 A. Tratamiento 1 hora en agua  
con hielo.

146



1



3



4



2



5



6



7



8



9

TABLA XXII. Tetrasómico tipo 6. Prometáfase 269 A.

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	11'90	1'75	1'82	11'74
	11'57	1'89		
2	12'01	1'47	1'51	11'79
	11'57	1'55		
3	13'20	1'10	1'11	12'98
	12'76	1'11		
4	13'20	1'03	1'02	12'66
	12'12	1'00		
5	9'52	2'52	2'41	9'58
	9'63	2'30		
6	10'60	1'33	1'36	10'77
	10'93	1'30		
	10'82	1'38		
	10'71	1'41		
7	11'14	1'02	1'03	11'31
	11'47	1'04		
8	9'84	1'76	1'76	10'01
	10'17	1'76		
9	8'87	1'73	1'66	9'20
	9'52	1'59		

118

FOT. 40 Cariotipo metafásico de la célula 284 G. Tratamiento 6 horas en agua  
con hielo.

229

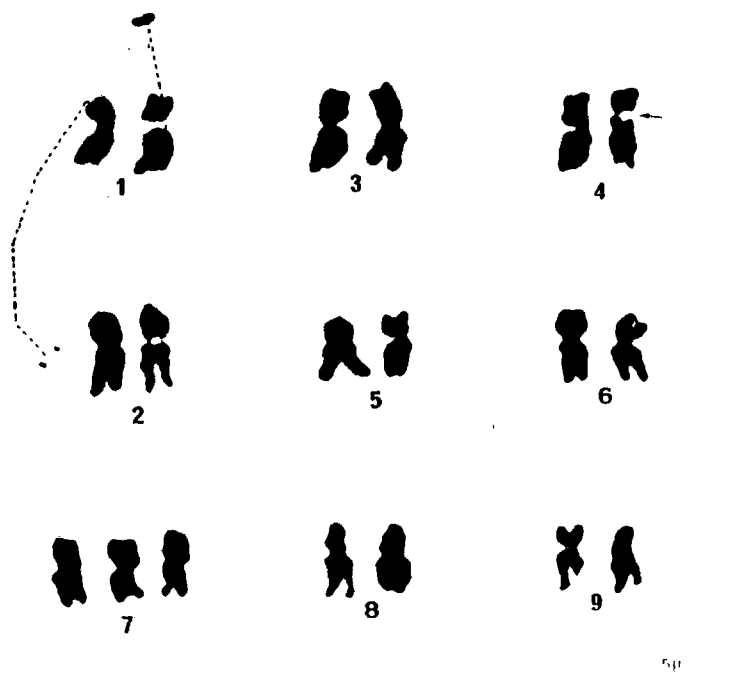


TABLA XXIII. Trisómico tipo 7. Metafase 284 G

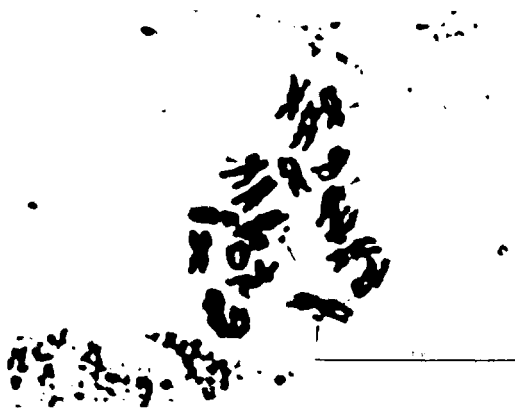
Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	10'45	1'80		
	10'07	2'00	1'90	10'26
2	12'69	1'43		
	12'69	1'43	1'43	12'69
3	13'43	1'25		
	13'06	1'06	1'16	13'25
4	11'94	1'29		
	11p94	1'00	1'15	11'94
5	9'33	2'13		
	9'70	1'89	2'01	9'52
6	11'57	1'38		
	11'94	1'29	1'34	11'76
7	10'07	1'25		
	9'70	1'17		
	9'70	1'17	1'20	9'82
8	10'82	1'64		
	10'45	1'33	1'49	10'64
9	9'33	1'78		
	10'45	1'80	1'79	9'89

151

FOT. 41 Cariotipo prometafásico de la célula 274 H. Tratamiento dos horas en  
agua con hielo.



152



1



3



4



2



5



6



7



8



9

5μ

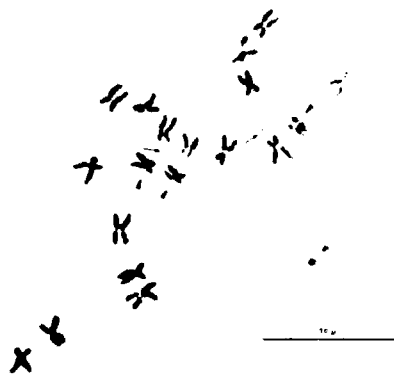
TABLA XXIV. Trisómico tipo 8. Prometáfase 274 H

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	11'66	1'82		
	11'29	1'65	1'73	11'48
2	13'92	1'47		
	13'29	1'52	1'50	13'61
3	12'42	1'30		
	11'79	1'24	1'27	12'11
4	11'29	1'05		
	10'53	1'00	1'03	10'91
5	11'16	1'97		
	11'54	1'88	1'93	11'36
6	11'91	1'50		
	11'41	1'53	1'52	11'66
7	10'03	1'11		
	10'03	1'11	1'11	10'03
8	9'78	1'79		
	9'91	1'82		
	10'03	1'67	1'76	9'91
9	9'03	2'27		
	8'78	2'18	2'23	8'91

154

FOT. 42 Cariotipo metafásico de la célula 267 I. Tratamiento 8 horas en agua  
con hielo.

155



1



3



4



2



5



6



7



8



9

TABLA XXV. Trisómico tipo 9. Metafase 267 I.

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	12'03	1'85		
	10'89	1'91	1'88	11'46
2	11'54	1'73		
	11'54	1'84	1'79	11'54
3	13'53	1'16		
	13'01	1'22	1'19	13'17
4	12'03	1'06		
	12'36	1'05	1'06	12'20
5	10'57	1'95		
	10'41	1'91	1'93	10'49
6	11'06	1'43		
	10'73	1'36	1'40	10'90
7	11'54	1'15		
	10'57	1'24	1'20	11'06
8	9'76	1'40		
	9'76	1'40	1'40	9'76
9	9'43	1'90		
	9'59	1'95		
	9'27	1'85	1'90	9'43

8. Identificación de un acrotrisómico 9.

En las tablas XXVI y XXVII se presentan los resultados numéricos de una metafase y una profase provenientes de una planta considerada inicialmente como trisómico tipo 9 del material de Butterfass, y que pudo ser correctamente identificada como acrotrisómico 9. Las referidas metafase y profase se presentan en las fotografías 43 y 44.

158

FOT. 43 Cariotipo metafásico de la célula 252 IX. Tratamiento 6 horas en agua  
con hielo.

159





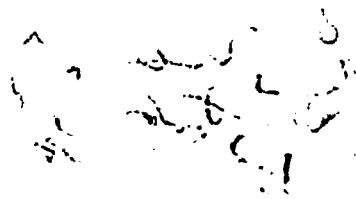
TABLA XXVI. Acrotriséxico tipo 9. Metafase 252-IX

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	14'44	1'60		
	11'85	1'67	1'64	13'15
2	11'85	1'37		
	11'85	1'46	1'42	11'85
3	10'74	1'23		
	11'85	1'13	1'18	11'30
4	11'66	1'10		
	11'85	1'00	1'05	11'76
5	10'74	2'22		
	11'11	2'00	2'11	10'93
6	11'48	1'58		
	11'29	1'44	1'51	11'39
7	11'11	1'14		
	9'26	1'08	1'11	10'19
8	10'55	1'48		
	10'74	1'64	1'56	10'65
9	9'26	1'78		
	7'77	1'10		
	9'26	2'13	1'96	8'76

161

FOT. 44 Cariotipo profásico de la célula 265 IX. Sin tratar.

162



2



3



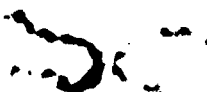
4



5



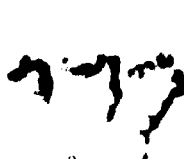
6



7



8



9

TABLA XXVII. Acrotrisoómico tipo 9. Profase 265-DX

Cromosoma	L%	r	$\bar{r}$	$\bar{L}\%$
1	19'41	1'22		
	17'47	1'25	1'24	18'44
2	10'43	1'87		
	11'64	2'00	1'94	11'04
3	16'50	1'00		
	13'59	1'00	1'00	15'05
4	11'16	1'09		
	10'19	1'10	1'10	10'68
5	7'76	2'20		
	8'25	2'40	2'30	8'01
6	10'19	1'63		
	8'25	1'83	1'73	9'22
7	12'62	1'17		
	11'16	1'09	1'13	11'89
8	7'28	1'50		
	6'31	1'60	1'55	6'80
9	6'79	1'33		
	10'19	2'50		
	9'70	2'33	2'42	8'89

## V. DISCUSION

### 1. Cariotipo metafásico en diploides

A partir del valor de  $r$ , podríamos definir los cromosomas 2, 3, 4, 6, 7 y 8 como metacéntricos siendo el resto submetacéntricos (Levan et al., 1964) aun cuando la clasificación del cromosoma 1 pueda resultar algo engañosa ya que no hemos querido considerar en ningún caso la longitud del satélite.

Examinando la tabla IV parece deducirse que este método puede llevar a una identificación positiva de los nueve cromosomas. Sin embargo, será necesario matizar varios aspectos. En primer lugar la separación completa se consigue con 15 células, pero no con cinco, aún siendo éstas escogidas. Esto representa ya un problema, puesto que es enormemente difícil encontrar 15 placas metafásicas de una sola planta. La introducción de un cromosoma extra en las plantas trisómicas, agravaría aún más la situación.

En segundo lugar, no se puede despreciar la posibilidad de que por irregular aplastamiento, una pareja esté cumpliendo los parámetros de otra, y la agrupación nuestra no haya sido correcta, tal como definen Matérn y Simak (1968).

Por último, cuando hablamos de que 15 células son capaces de identificar los 9 cromosomas, no debemos olvidar que éstas han sido elegidas de entre muchas más, no sólo de una planta.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bosemark y Bormotov (1971) aún cuando los tamaños que nosotros hemos obtenido nos han hecho cambiar la nomenclatura entre los cromosomas 6 y 7.

En relación con tinciones diferenciales de Giemsa, todos nuestros intentos resultaron infructuosos coincidiendo así con los realizados por Bosemark y

Lasa (1973), Singh y Romagosa (1981) según comunicaciones personales, aún cuando los últimos resultados de Chugunkova et al. (1979) abren una cierta esperanza a posteriores estudios.

Por todo lo anterior, la técnica del cariotipo metafásico no nos parece totalmente fiable para identificar positivamente el cromosoma extra de una planta trisómica, aun cuando en algunos casos, con cromosomas muy específicos y en conjunción con otras técnicas, el sistema pueda tener utilidad como veremos posteriormente.

## 2. Haploides

El cruzamiento tetraploide-diploide fue realizado cinco años antes de la siembra, con lo cual era de prever una cierta pérdida en el poder germinativo de las semillas, en particular de haploides y aneuploides.

Sin embargo, la primera siembra, que presentó una germinación que no llegó al 8% indicó claramente que además de la edad de las semillas, existió un problema externo que fué el mal funcionamiento del invernadero. Esto obligó a repetir las siembras.

Las germinaciones de la 2ª y 3ª fueron respectivamente 29.3% y 35.7% que si bien son bajas, se acercan a lo normal.

La obtención de una única planta, es evidente que no fue un resultado satisfactorio, puesto que estos cruzamientos producen mayores éxitos, pero para nuestro objetivo de obtener cariotipos haploides era suficiente.

El análisis de las cuatro metafases, presentado en la tabla VI, muestra practicamente lo mismo que cuando utilizamos cinco metafases diploides. Sin embargo en este caso el solape entre cromosomas es muy grande. La razón, aparte de que el número de medidas esté dividido por dos, es que el número de células entre las que se han elegido estas cuatro, es mínimo en comparación con las que utilizamos con las cinco diploides.

A partir de aquí, interviene la condensación como factor diferenciador. Se trataba de probar, si en estados anteriores a la metafase, los cromosomas presentaban aspectos diferenciadores. En el análisis de la tabla VII se comprobó que el solape ha disminuido mucho, más de lo que cabría esperar por la simple suma de dos células más.

De las prometafases, pero sobre todo de las profases podemos entresacar a simple vista una serie de aspectos que nos servirán para la continuación del trabajo.

Por tamaño, el juego cromosómico puede dividirse en tres grupos: cromosomas grandes 1, 3 y 4; cromosomas medianos 2, 5 y 6; cromosomas pequeños 7, 8 y 9. Al hablar de profases, el concepto tamaño se confunde con condensación. Cromosoma grande quiere decir de lenta condensación.

Los cromómeros parecen ser constantes, y cada cromosoma tiene algunos lo suficientemente representativos.

Es evidente que los cromómeros se van fusionando conforme avanza la condensación, pero este proceso no enmascara excesivamente los cromómeros principales.

A la vista de estas indicaciones que facilitan la identificación de los cromosomas a través de prometafase y profase, es por lo que se ahondó en estos estudios con el empleo de plantas diploides, que a continuación discutiremos.



### 3. Cariotipo prometafásico en diploides

Al hacer el estudio de los resultados de la tabla VIII parecen resaltar dos conclusiones. La primera es que todos los cromosomas pueden ser diferenciados a excepción del 3 y el 4. Esto tiene importancia si tenemos en cuenta que sólo hemos empleado cinco células y que no habían sido elegidas entre muchas.

La segunda es que todos los índices centroméricos han aumentado, y aunque el estudio de la significación estadística lo haremos en otro lugar, parece claro que tal como dice Sasaki (1961) los cromosomas muy contraídos tienen tendencia a tener los centrómeros centrales, o lo que es lo mismo los brazos largos tardan más en la definitiva contracción.

Otro aspecto que podemos deducir de la observación de las fotografías, es que las drogas y el frío producen una condensación artificial exagerada que oculta el parecido entre cromosomas homólogos. Una pareja con la misma cantidad de cromatina, y los mismos puntos básicos de condensación, tiende a parecerse a simple nivel óptico, más a su pareja, que a cualquier otro cromosoma del complemento.

Como conclusión de este apartado cabría decir que en ausencia de inhibidores del huso, condensadores del citoplasma o de otros artefactos producidos por las drogas, la realización de un buen squash es francamente dificultosa. Sin embargo, los resultados son mucho más significativos por lo que siempre será preferible la búsqueda de placas metafásicas en este estado de semicondensación, ya que permite alcanzar altos niveles de identificación cromosómica.

#### 4. Cariotipo profásico

En estos momentos la discusión tiene que ser enfocada en dos aspectos. En primer lugar, el numérico, como hemos venido haciendo hasta aquí, pero un segundo aspecto se incluye ahora en la discusión, con gran importancia, que es el relativo a los cromómeros, tanto en su forma como en su localización.

El análisis numérico, es decir, el referido a longitudes y razones entre brazos, que puede observarse en la tabla IX, presenta una fuente de errores, apreciable, que es la relativa a dictaminar con exactitud los puntos finales de los cromosomas ya que junto a la técnica citológica del squash, que puede producir rupturas de brazos o alargamientos artificiales de cromosomas, la ausencia en muchos casos, de formaciones teloméricas características, dificultan la determinación de los extremos finales. Así mismo es observación de este autor, que puede apreciarse en las fotografías 21 a 29, que en estados intermedios de las profases estudiadas aparecen nuevas formaciones cromoméricas en los extremos que no eran visibles con anterioridad, lo que apoyaría la hipótesis de altas posibilidades de error en la medición cromosómica en este estado.

De la observación de la tabla IX, parece desprenderse que el cromosoma 1 es muy grande en este estado (16,6%) mientras que los cromosomas 6 y 8, son más pequeños de lo que les corresponde (9,44 y 8,23%), o lo que es lo mismo han tenido una condensación prematura.

Es interesante notar que aparecen similitudes entre cromosomas que en análisis de otros estados no se solapaban, como por ejemplo los cromosomas 2, 5 y 9. También parece interesante el hecho de que la F para índice centromérico entre células, no es en absoluto significativa.

Al igual que ya comentamos al utilizar prometafases, al que los homólogos se encuentren en el mismo estado de condensación, con cromómeros idénticos, hace

que, a pesar de las modificaciones producidas por el squash, un cromosoma se parezca más a su homólogo que a cualquier otro del complemento.

El ya comentado segundo aspecto del análisis del cariotipo profásico, es decir el relativo a cromómeros y su situación, nos permita la elaboración de unos "monos" teóricos, que se muestran en la fotografía 45, sobre los cromosomas profásicos. Es el momento de hacer la advertencia ya comentada, de que a lo largo de la profase se van produciendo fusiones de cromómeros, por lo que en estos monos se pretende ofrecer únicamente una visión general en un estado intermedio, pero que nos permite de esta forma la identificación de los cromosomas.

A continuación daremos unos pocos rasgos característicos de cada cromosoma, suficientes a nuestro entender para poder distinguirlos, pero sin extendernos demasiado.

Cromosoma 1.- Es en todo momento el más largo del complemento, y también el más estrecho, es decir, está completamente estirado. En metafase muestra claramente la región del organizador nucleolar, mientras en profase tiene mayor dificultad su localización. Tiene cromómeros muy característicos, cuatro principales en el brazo corto, dividiéndose el brazo largo en tres partes: la primera con cuatro cromómeros muy grandes y marcados; la segunda con tres o cuatro medianos; la tercera con varios pequeños y difíciles de identificar.

Cromosoma 2.- En metafase es el más grande del complemento pero en profase presenta problemas de parecido con los pequeños porque tiene temeraria y rápida condensación. Por esto, siempre aparece grueso y muy teñido. Tiene un cromómero grande y uno mediano en el brazo corto y cinco en el largo estando los cuatro primeros agrupados en

171

FOT. 45 Ordenación cromomérica de los cromosomas profásicos.



dos parejas. Suele doblarse formando una S.

Cromosoma 3.- Al igual que el 1 es un cromosoma alargado y estrecho, pero se distingue de él porque es casi perfectamente metacéntrico. El brazo corto tiene un poco menos de cromatina y por ello los cromómeros están más laxos. Este brazo consta de 4 cromómeros grandes y dos medianos en su extremo, el último no se pierde y suele estar presente como si fuera un telómero marcado. En el brazo largo aparecen, cuatro cromómeros grandes dos a dos, y más al extremo uno grande y uno medio, todos con la característica de ser más gruesos que los del brazo corto; el final de este brazo aparece un poco deshilachado. No suele estar doblado.

Cromosoma 4.- Es otro de los tres cromosomas metacéntricos. Se parece algo al tres, pero tiene los cromómeros más juntos. Suele adquirir una forma de C. Tiene cinco cromómeros en el brazo corto y otros cinco en el largo aunque estos un poco más gruesos. Sin embargo tiene una característica inconfundible, los dos cromómeros distales del brazo corto tienen tendencia a separarse de la masa del cromosoma y pueden encontrarse muchas micras lejos. Esto puede enlazar con las ideas de Romagosa (1982) y Nakamura (1979) de que hay algún otro cromosoma implicado en la organización nucleolar.

Cromosoma 5.- Este cromosoma suele ser fácilmente distinguible en metafase, pero en profase, también tiene personalidad propia, puesto que posee en el final del brazo largo, un gran cromómero que le hace como de cola; así pues este cromosoma, que es alargado, adquiere forma de L. En el brazo corto tiene dos cromómeros medianos y uno pequeño con tendencia a difuminarse. En el largo tiene cuatro grandes cromómeros. El brazo corto es mucho menor que el largo.

Cromosoma 6.- Es un cromosoma muy homogéneo en su condensación en ambos brazos y los homólogos suelen parecerse enormemente. Como el cromosoma dos, se condensa bastante temprano en relación a los otros. Suele ser recto teniendo tres cromómeros en el brazo corto y cinco en el brazo largo con tendencia a difuminarse los dos de los extremos. Su estructura es muy estable ante el squash.

Cromosoma 7.- Es distinguible rápidamente en profase porque forma un círculo o una G muy cerrada. Es metacéntrico y con los mismos cromómeros y de la misma forma y tamaño en ambos brazos, presentando en cada uno, dos cromómeros grandes cercanos, y dos medios algo más alejados.

Cromosoma 8.- En un cariotipo profásico es el que aparece más pequeño. No presenta una estructura cromomérica muy definitoria, con dos grandes y uno pequeño en el brazo corto y tres grandes y algunos pequeños y desespiralizados en el largo. Todos los cromómeros grandes tienen tendencia a formar una masa homogénea por su gran proximidad. El cromosoma presenta cierta tendencia a doblarse.

Cromosoma 9.- En el brazo corto tiene dos cromómeros medianos y uno pequeño mientras que en el largo tiene dos grandes, que pueden estar muy alejados, y una serie de cromómeros pequeños al final.

Aun cuando pudiera parecer de interés la comparación de estas identificaciones cromosómicas a través de cromómeros profásicos mitóticos, con las presentadas por Nakamura (1979) trabajando en paquitena, una serie de factores que a continuación exponemos nos hacen deshechar tal idea.

En primer lugar y fundamentalmente los estados de condensación en los que Nakamura trabaja, no son equiparables a los que se obtienen con profases mitóticas, únicamente nuestra célula 282 pudiera tener cierto parecido. Por otro lado y aún cuando existen afirmaciones muy similares, como las relativas al mayor tamaño del cromosoma 9 en relación con los otros pequeños, las numeraciones empleadas por Nakamura no son las utilizadas en los cariotipos metafásicos, lo que nos crea una fuerte confusión al encontrar casos como el de su cromosoma paquiténico 4 que muestra gran semejanza con el 2 de este estudio. Así mismo, la estrecha franja de tiempo en que los dos estados meiótico y mitótico podrían ser comparados, nos lleva a encontrarnos con afirmaciones de Nakamura dando longitudes muy variables a los bivalentes 1,2,3 y 4 que son los cromosomas que en nuestro estudio aparecen de mayor tamaño en profase, al igual que su afirmación de la gran variación de los valores de  $r$  en cromosomas subtelocéntricos. Por estas razones, no consideramos de interés en la presente tesis la realización de este estudio de comparación, que obligará a trabajos posteriores.

Como resumen de este apartado de cariotipos profásicos, podemos decir que a través de los mismos, se obtiene una gran clarificación en los problemas de identificación positiva de los cromosomas de *Beta vulgaris*, como veremos posteriormente en las aplicaciones prácticas sobre identificación de la serie de trisómicos primarios.



### 5. Evolución del cromosoma desde profase a metafase.

Aún con el problema ya reseñado, de determinar el punto final del cromosoma en los estados profásicos, hemos querido realizar este estudio de evolución de los valores de  $L\%$  y  $r$  a lo largo de las profases, prometafases y metafases por la luz que sus resultados podría ofrecer para un mejor entendimiento de la contracción cromosómica. Como se puede apreciar en las tablas X y XI, los cálculos que hemos realizado han buscado únicamente el encontrar posibles diferencias significativas entre las medias de estos valores en cada estado, para cada cromosoma, lo que nos permite así observar el comportamiento individual de cada uno de ellos.

Con los resultados obtenidos de las longitudes totales porcentuales, puede construirse el cuadro resumen que se incluye a continuación, en el cual los signos  $<$ ,  $>$  e  $=$  se refieren siempre a un nivel de confianza del 95%.

CROMOSOMA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
METAFASE - PROMETAFASE	=	=	=	=	=	=	=	=	=
PROMETAFASE - PROFASE	<	=	=	=	=	>	=	>	=
METAFASE - PROFASE	<	>	<	=	=	>	=	>	=

Del mismo, parece deducirse que los 9 cromosomas pueden agruparse basados en la evolución de su longitud porcentual del complemento cromosómico, en tres grupos:

- Cromosomas 4,5,7 y 9. Presentan un porcentaje de  $L$  constante en los tres estados.
- Cromosomas 2,6 y 8. Estos presentan una mayor condensación en los estados de profase, que al llegar a prometafase, se normaliza adquiriendo valores

similares a los de metafase. De entre ellos se acusa más el efecto entre los cromosomas 6 y 8.

- c. Cromosomas 1 y 3. En los estados profásicos se encuentran fuertemente desespiralizados, normalizándose la situación al llegar a prometafase. El fenómeno se acusa fuertemente en el cromosoma 1.

Esta clasificación en tres grupos nos hace pensar que la contracción cromosómica no es sincrónica entre los diversos cromosomas, ya que, como hemos comentado, junto a un tipo de contracción que podría llamarse "patrón" en los cromosomas 4,5,7 y 9, podemos encontrar los dos extremos, de fuerte condensación inicial en 2,6,8 y de fuerte desespiralización en 1 y 3. Estos resultados nos llevan a mostrarnos contrarios a las teorías de Bajer (1959) que presentaba una sincronía en la contracción, cumpliéndose sin embargo el hecho descrito por Colombo (1952), de la existencia de cromosomas inicialmente más largos que otros y que posteriormente en metafase terminaban siendo los más cortos.

En cuanto a la evolución de los valores de  $r$ , se puede elaborar un cuadro similar al presentado anteriormente, el cual se incluye a continuación.

CROMOSOMA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
METAFASE - PROMETAFASE	<	<	=	=	<	=	<	<	=
PROMETAFASE - PROFASE	>	=	=	=	=	<	=	=	=
METAFASE - PROFASE	>	<	>	>	<	<	=	=	=

El análisis de este cuadro nos permite así mismo la clasificación de los cromosomas en tres grandes grupos:

- a. Cromosomas 7,8 y 9. Su razón de brazos es similar entre profase y metafase, aún cuando en los cromosomas 7 y 8 la condensación del brazo corto parece

ser más fuerte en un principio para posteriormente producirse la del brazo largo.

- b. Cromosomas 2,5 y 6. En profases presentan su brazo largo proporcionalmente más desespiralizado que el corto. En el caso de 6 esta desproporción se corrige al llegar a prometafase mientras que en 2 y en 5 la corrección se produce entre prometafase y metafase.
- c. Cromosomas 1,3 y 4. En la profase presentan su brazo corto más desespiralizado proporcionalmente que el largo. En el caso de 3 y 4 este hecho se corrige progresivamente entre profase y metafase, mientras que en 1 se presenta un proceso escalonado acortando fuertemente el brazo corto entre profase y prometafase y posteriormente el largo entre prometafase y metafase.

Estos resultados y agrupaciones parecen indicar, que al igual que se presentaba asincronía en cuanto a la condensación intercromosómica, es un hecho la asincronía entre brazos de algunos cromosomas. Estos hechos concuerdan con los que presenta Svardson (1941) sobre independencia de contracción entre brazo corto y brazo largo. Un fuerte punto de discusión que abren estos resultados, sería la fiabilidad de gran parte de los idiogramas aparentes que se han publicado. Hemos podido comprobar como, tanto las longitudes porcentuales como las razones entre brazos, pueden variar al no ser sincrónica la contracción, de aquí que un idiograma aparente puede variar fuertemente según el momento en que la célula sea estudiada, no sólo por diferencias extremas entre profase y metafase, sino aún dentro de estas últimas, con aplicación de productos químicos de los que se ha podido entrever en apartados anteriores su actuación dispar entre cromosomas y brazos, (Sasaki, 1961).

#### 6. Estudio de la contracción del cromosoma

El objetivo de este apartado, en unión con el anterior, es caracterizar biométricamente el proceso de condensación cromosómica que ocurre durante la profase y prometafase somática.

Dados los errores, comentados repetidamente, que puede acarrear la determinación exacta del punto final del brazo cromosómico, hemos querido realizar este estudio con segmentos cromosómicos perfectamente definidos que van desde el centrómero a cromómeros identificados en cada brazo.

Para lograr este estudio biométrico sería necesario conocer con exactitud la posición relativa en el tiempo de mitosis de las células empleadas, e intentar posteriormente mediante expresiones matemáticas sencillas reproducir óptimamente el proceso. No es posible, sin embargo, medir de un modo sencillo y eficaz el tiempo transcurrido desde el comienzo de la profase a un subestado profásico o metafásico particular, ya que, si bien se han desarrollado técnicas para la sincronización de divisiones en meristemo radicular de remolacha (Cistué, 1980), microvariaciones en la sincronización debidas por ejemplo a la situación relativa de células en el meristemo radicular pueden conducir a diferencias apreciables en la medida del proceso. Así, hemos adoptado una forma alternativa de medir el tiempo transcurrido en la profase mitótica al utilizar como parámetro la longitud total del complemento cromosómico. El problema que se presenta en este caso, es que, al no saber si existe una relación lineal entre longitud del complemento y tiempo transcurrido, nos es imposible hacer inferencias sobre el proceso desde un punto de vista estrictamente temporal, salvo que se asuma la relación lineal antes citada. En cualquier caso, el estudio de la condensación individual de cada cromosoma, pueda revelarnos diferencias de cromosoma a cromosoma o tal vez incluso de brazo a brazo.

El estudio de las gráficas 1 a 9 en unión con lo ya comentado en el apartado anterior nos llevaría a una definición de la contracción de cada cromosoma,

que puede resumirse como sigue.

Cromosoma 1.- Los dos cromómeros del brazo corto se ajustan a una acentuada curva exponencial, es decir sufren una fuerte contracción de profase a metafase como ya hemos comentado por los valores de  $r$ . Los del brazo largo se ajustan a dos rectas lo cual indica una contracción lenta y equilibrada con el resto del complemento.

Cromosoma 2.- Ya dijimos que este cromosoma al igual que 6 y 8 tienen una contracción temprana, de acuerdo con esto los cuatro cromómeros se adaptan a curvas exponenciales y además en el caso de este cromosoma los dos brazos siguen un comportamiento prácticamente similar.

Cromosoma 3.- Los dos cromómeros centrales siguen leves curvas exponenciales mientras que los dos externos siguen logarítmicas. Esto tiene dos consecuencias: en primer lugar ambos brazos se comportan exactamente igual por lo que no pierde en ningún momento su aspecto metacéntrico. En segundo lugar la contracción tardía de los cromómeros distales hace que el cromosoma en profase sea más largo de lo que corresponde a su verdadero tamaño final.

Cromosoma 4.- Los datos obtenidos de  $r$  y  $L\%$  parecen decir que la contracción de este cromosoma es completamente equilibrada, sin embargo, la gráfica muestra que los dos cromómeros del brazo largo siguen una línea recta. El cromómero cercano del brazo corto sigue una curva exponencial pero muy leve. Sólo sigue una exponencial el cromómero lejano pero esto no es raro puesto que ya dijimos que un par de cromómeros de este brazo tienen tendencia a alejarse y esta es la causa de este pequeño desequilibrio con los datos generales.

Cromosoma 5.- Este cromosoma parece seguir un comportamiento equilibrado en ambos brazos, ya que el brazo corto se condensa rápidamente por la poca cantidad de cromatina que tiene, mientras que al largo le cuesta reorganizarse por lo que sigue dos curvas logarítmicas. Ya dijimos que los  $r$  siguen una disminución progresiva.

Cromosoma 6.- Igual que el 2, Condensación temprana. Cuatro curvas exponenciales, Perfectamente equilibrado.

Cromosoma 7.- Sus curvas de contracción siguen prácticamente cuatro líneas rectas. Sin embargo los dos cromómeros del brazo largo se ajustan mejor a unas leves logarítmicas. Esto se debe a que el brazo largo en su última fase se compacta más que el corto y esto es lo que hace que en PM el  $r$  sea 1,24 mientras que en metafase es casi metacéntrico total con un  $r$  de 1,13.

Cromosoma 8.- La contracción de este cromosoma es un poco rara porque sigue en todo al 2 y al 6 en compactación rápida y desde luego el brazo corto sigue dos claras curvas exponenciales. Sin embargo el brazo largo es logarítmico y va retrasado en relación al largo. Esto puede ser debido a que el brazo largo tiene un par de cromómeros muy cercanos al centrómero pero luego toda la cola son cromómeros pequeños que tardan en compactarse.

Cromosoma 9.- En profase está demasiado desespiralizado principalmente en el brazo largo y por ello tiene más tamaño del que le corresponde lo cual ayuda a reconocerlo. Pero en PM ya ha alcanzado la normalidad porque mientras el brazo corto sigue una línea recta, el brazo largo sigue una acusada línea exponencial es decir un rápido acortamiento. Los dos extremos del cromosoma son deshilachados y se condensan a la vez por lo cual no le ocurre lo que al 8.

Las conclusiones que parecen desprenderse de este apartado, relativas a la contracción de los segmentos cromosómicos estudiados, confirman en su casi totalidad las obtenidas del estudio del apartado anterior y ciertamente nos reafirman en la conclusión de la asincronía intercromosómica e interbrazos del proceso de condensación.

#### 7. Identificación positiva de la serie trisómica.

Mediante la utilización de los tres estados mitóticos estudiados a lo largo del presente trabajo, es decir, metafase, prometafase y profase, se abordó la identificación cromosómica de la serie homocigótica de trisómicos primarios.

El tipo trisómico 1 fue adscrito al grupo morfológico denominado con la letra E, siendo la identificación inmediata, puesto que en este grupo el cromosoma que se encuentra triplicado es el del organizador nucleolar, perfectamente identificable en metafase por el satélite, y en profase por su gran tamaño.

El tipo trisómico 2 fue adscrito al grupo morfológico denominado B y se identificó en prometafase, porque sólo se confunde con 6 y 8 por índice centromérico pero se distingue de ellos fácilmente por su gran tamaño, y en profase porque sólo se puede confundir con el 9, pero se distingue de él por tener muchos más cromómeros y muy característicos.

Los grupos morfológicos C y D resultaron ser en metafase los dos cromosomas metacéntricos grandes, es decir, 3 y 4. Puesto que por medidas se solapan tanto en prometafase como en profase, se acudió al estudio de los cromómeros, llegándose a la conclusión de que el grupo C corresponde al tipo trisómico 4 y el grupo D el tipo trisómico 3.

El grupo morfológico F resultó ser el tipo trisómico 5 que es perfectamente identificable en prometafase, en profase y en realidad también en metafase pues es el cromosoma con centrómero más distal.

El tipo trisómico 6 se adscribió al grupo morfológico A y fue fácilmente identificable en prometafase, puesto que sólo está cercano por índice centro



mérico a los cromosomas 2, 8 y aún de estos se diferencia por su distinto tamaño. De este grupo morfológico se utilizó también para su observación una planta tetrasómica, que por su curiosidad, es la que se muestra en la fotografía.

El cromosoma metacéntrico pequeño, es decir, el cromosoma 7 que por ambas características es inconfundible, resultó estar triplicado en el grupo morfológico G.

Los grupos morfológicos restantes, es decir, H y I, fueron adscritos a los cromosomas 8 y 9, y lo fueron así evidentemente porque eran distinguibles por las características que hemos ido citando a lo largo de este apartado.

8. Identificación de un acrotrisómico 9

Mediante la utilización simultánea de los estados mitóticos descritos, se ha conseguido la identificación positiva de una deficiencia cromosómica en una planta trisómica del grupo 9. Un análisis detallado de la secuencia cromomérica en profase nos ha permitido identificar este individuo como acro 95<sup>9L</sup>, esto es la deficiencia se observa en el brazo largo del cromosoma 9.

## VI. CONCLUSIONES

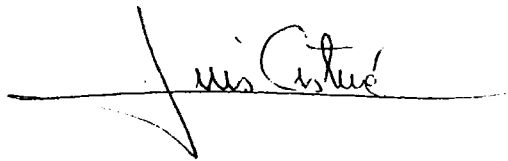
De los resultados anteriormente presentados y discutidos, parecen desprenderse las siguientes:

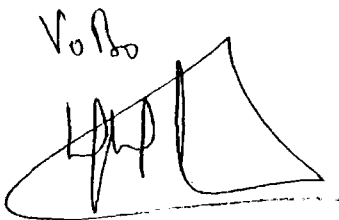
- 1.- Se ha elaborado un nuevo cariotipo metafásico en Beta vulgaris L. que corrige ligeramente el hasta ahora generalmente aceptado de Rosemark y Bormotov (1971).
- 2.- La utilización del cariotipo metafásico "por se" en Beta vulgaris, L. no permite la fácil identificación de la totalidad de los cromosomas del complemento.
- 3.- Estudios realizados en plantas haploides sugirieron la utilidad de estados mitóticos anteriores a metafase para una mejor identificación cromosómica.
- 4.- Modificaciones en el pretratamiento de los meristemas radiculares, han permitido incrementar el porcentaje de células en estados profásicos y prometafásicos.
- 5.- Aún con dificultades para la realización de buenos squash, se ha conseguido la obtención de un cariotipo prometafásico que permite alcanzar altos niveles de identificación cromosómica.
- 6.- El empleo de parámetros cuantitativos (L y r) junto con la secuencia cromosómica permiten la fácil identificación de los 9 cromosomas de Beta vulgaris L. Se presenta un idiograma profásico así como la descripción individual de los cromosomas.
- 7.- Se ha estudiado la contracción cromosómica durante la profase y prometafase somática. Los resultados obtenidos indican la existencia de una asincro-

nía en la contracción de los diversos cromosomas e incluso entre los brazos de un mismo cromosoma. Se describen la secuencia de contracción de los 9 cromosomas del complemento.

- 8.- Las asincronías descritas permiten poner en duda la fialidad de algunos idiogramas aparentes desarrollados en distintos subestados metafásicos.
- 9.- El empleo conjunto de los tres estados mitóticos comentados, ha permitido la identificación positiva de la totalidad de los componentes de la serie de trisómicos primarios de Beta vulgaris, L., e incluso la detección de anormalidades subcromosómica.

Zaragoza, Enero de 1.983



VoBo  


REFERENCIAS

- ADATI, S., MISTUISHI, S.  
1962 Karyotype analysis in the Beta species.- Bull. Fac. Agric. Mie. Univ.  
25: 25-32
- AHLOOWALIA, B.S.  
1972 Trisomics and aneuploids of ryegrass Lolium perenne.- Theoret. Appl.  
Genet., 42: 363-367
- ANDO, S., TAKAHASHI, M.  
1969 Karyotypes of the species in Genus Beta.- Mem. Fac. Agr. Hokkaido Univ.  
7 (1): 51-62
- ARNOLD, C.G., KRESSEL, M.  
1965 Über das gehäufte auf treten trisomer Pflanzen in der Nachkommenschaft  
diploider. Röntgenmutanten bei Oenothera barteriana.- Z. Vererbungsl.  
96: 83-92
- ARORA, O.P., KHOSHOO, T.N.  
1969 Primary trisomics in moss verbena.- Euphytica, 18: 237-248
- ASKER, S.  
1971 Apomixis and sexuality in the Potentilla argentea complex. III. Euploid  
and aneuploid derivatives (including trisomics) of some apomictic  
biotypes.- Hereditas, 67: 111-141
- AVERY, A.G.  
1959 Extra Chromosomal Types. In Blakeslee: The Genus Datura (A.G. Avery,  
S. Satina, and J. Rietsema, eds.), Ronald Press Company, New York,  
pp. 86-109
- BABCOCK, E.G., NAVASHIN, M.  
1930 The genus Crepis.- Bibliogr. Genet., 6: 1-90
- BAJER, A.  
1959 Change of length and volume of mitotic chromosomes in living cells.-  
Hereditas, 45-4: 579-596
- BAMMI, R.K.  
1965 Cytogenetics of Rubus. IV. Pachytene morphology of Rubus parvifolius  
L. chromosome complement.- Can. J. Genet. Cytol., 7: 254-258
- BARTON, D.W.  
1950 Pachytene morphology of the tomato chromosome complement.- Am. J. Bot.,  
37: 639-643
- BLAKESLEE, A.F., BELLING, J.  
1924 Chromosomal mutations in the Jimson weed, Datura stramonium.-  
J. Hered., 15: 195-206
- BORMOTOV, V.E., SCHERBAKOVA, A.M., LUNEVA, M.  
1973 Cytological characteristic in trisomic types of sugar beet.- Nauka  
Tekh: 27-34

- BOSEMARK, N.O.  
1971 Haploids and homozigous diploids, triploids and tetraploids in sugarbeet.- *Hereditas*, 69: 193-204
- BOSEMARK, N.O.  
1972 Sobre técnicas citológicas en *Beta vulgaris* L. (Comunicación personal)
- BOSEMARK, N.O., BORMOTOV, V.E.  
1971 Chromosome morphology in a homozigous line of sugarbeet.- *Hereditas*, 69: 205-212
- BROWN, S.W.  
1949 The structure and meiotic behavior of the differentiated chromosomes of tomato.- *Genetics*, 34: 437-461
- BUSS, G.R., CLEVELAND, R.W.  
1971 Meiosis of trisomics of diploid alfalfa.- *Crop Sci.*, 11: 808-810
- BUTTERFASS, TH.  
1959 Ploidie und chloroplastenzahlen.- *Ber. Dent. Bot. Ges.*, 72: 440-451
- BUTTERFASS, T.  
1964 Die chloroplastenzahlen in verschiedenartigen Zellen trisomer Zuckerruben (*Beta vulgaris*).- *Z. Bot.*, 52: 46-77
- CATCHESIDE, D.G.  
1954 The genetics of brevistylis in *Oenothera*.- *Heredity*, 8: 125-137
- CHEN, C.C., GRANT, W.F.  
1968 Morphological and cytological identification of the primary trisomics of *Lotus pedunculatus*.- *Can. J. Genet. Cytol.*, 10: 161-179
- CHIANG, B.Y., GRANT, W.F., CHIANG, M.S.  
1979 The somatic karyotype of cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*).- *Euphytica*, 28: 41-45
- CHUGUNKOVA, T.V., GOSTEV, A.A., SHEVTSOV, I.A.  
1979 Investigation of the sugar beet Karyotype by Giemsa differential staining.- *Tsitol. Genet.*, 13 (4): 262-266
- CISTUE, L.  
1979 Estudios citogenéticos en remolacha azucarera, *Beta vulgaris* L. Tesina Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- COLOMBO, G.  
1952 L'accorciamento dei cromosomi nella mitosi e nella meiosi.- *Experientia*, 8: 15-16
- CONGER, A.D., FAIRCHILD, L.M.  
1953 A quick-freeze method for making smear slides permanent.- *Stain Technolog.*, 28 (6): 281
- DHESI, J.S., LOBANA, K.S.  
1974 Trisomics in *Brassica carinata*.- *Sci. Cult.*, 40: 320-321

- DHILLON, T.S., GARBER, E.D.  
1960 The genus Collinsia. X. Aneuploidy in C. heterophylla.- Bot. Gaz., 121: 125-133
- DYCK, P.L.  
1964 Desynapsis in diploid oats, Avena strigosa, and its use in the production of trisomics.- Can. J. Genet. Cytol., 6: 238
- DYER, A.F.  
1963 The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations.- Stain. Technol., 38: 85-90
- EMERSON, S.H.  
1936 The trisomic derivatives of Oenothera lamarckiana.- Genetics, 21: 200-224
- ENE, L.S.O.  
1968 Cytogenetics of trisomics and tetrasomics in some species of Iberis L. (Cruciferae).- Cytologia, 33: 82-93
- ENDRIZZI, J.E.  
1966 Use of haploids in Gossypium barbadense L. as a source of aneuploids.- Curr. Sci., 2: 34-35
- ERNST, H.  
1939 Zytogenetische Untersuchungen an Antirrhinum majus L.- Zeitschr. Bot., 34: 81-126
- FISCHER, H.E.  
1956 Untersuchungen an Zwillingen von Beta vulgaris L.- Züchter, 26: 136-152
- FISCHER, H.E.  
1962 Über Vorkommen und Bedeutung Verschiedener Genomstufen bei Beta vulgaris L.- Ibid., 32: 40-48
- FRANDSEN, N.O.  
1967 Haploid production in potato breeding material with intensive backcrossing to wild species.- Zuechter., 37: 120-134
- FROST, H.B., MANN, M.C.  
1924 Mutant forms of Matthiola resulting from nondisjunction.- Am. Nat., 58: 569-572
- GARBER, E.D.  
1947 The pachytene chromosomes of Sorghum intrans.- J. Hered., 38: 251-252
- GARBER, E.D.  
1964 The genus Collinsia. XXII. Trisomy in C. heterophylla.- Bot. Gaz., 125: 46-50
- GERASSIMOVA, H.  
1940 A translocation between the B- and D-chromosomes and the trisomic effect of the B-chromosome in Crepis tectorum L.- Akad. Nauk SSSR Izv. Ser. Biol., 1: 31-44

- GILL, B.S., KIMBER, G.  
1974 A giemsa C-banding technique for cereal chromosomes.- Cereal Research Communications, 2 (2): 87-94
- GILL, B.S., VIRMANI, S.S., MINOCHA, J.L.  
1970 Primary simple trisomics in pearl-millet.- Can. J. Genet. Cytol., 12: 474-483
- GILLIES, G.B.  
1968 The pachytene chromosomes of a diploid Medicago sativa.- Can. J. Genet. Cytol., 10: 788-793
- GILLIES, G.B.  
1971 Pachytene studies in  $2n=14$  species of Medicago.- Genetica, 42: 278-298
- GIRALDEZ, R., ORELLANA, J.  
1979 Metaphase I bonds, crossing-over frequency, and genetic length of specific chromosome arms of rye.- Chromosoma (Berl.), 72: 377-385
- GOODSPEED, T.H., AVERY, P.  
1939 Trisomic and other types in Nicotiana sylvestris.- J. Genet., 38: 381-458
- GOODSPEED, T.H., AVERY, P.  
1941 The twelfth primary trisomic type in Nicotiana sylvestris.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 27: 13-14
- GREILHUBER, J.  
1977 Why plant chromosomes do not show G-bands.- Theor. Appl. Genet., 50: 121-124
- HACKER, J.B., RILEY, R.  
1963 Aneuploids in oat varietal populations.- Nature (Lond.), 197: 924-925
- HAGA, T., KURABAYASHI, M.  
1952 Genom and polyploidy in the genus Trillium. Genom analysis by means of differential reaction of chromosome segments to low temperature.- Cytologia, 18: 13-28
- HAMMOND, B.L.  
1966 Homozygous diploid sugar beets.- J. Am. Soc. Sugar Beet Tech., 14 (1): 75-78
- HANNA, W.W., SCHERTZ, K.F.  
1970 Inheritance and trisomic linkage of seedling characters in Sorghum bicolor (L.) Moench.- Crop Sci., 10: 441-443
- HAUNOLD, A.  
1968 A trisomic hop, Humulus lupulus L.- Crop Sci., 8: 503-505
- HAYNES, F.L.  
1964 Pachytene chromosomes of Solanum canasense.- J. Hered., 55: 168-173



- HEITZ, E.  
1928 Das Heterochromatin der Moose. I.- Pringsheims Jb. wiss. Bot., 69: 762
- HEITZ, E.  
1929 Heterochromatin, chromozentren, chromomeren.- Ber. Dtsch. bot Ges.,  
47: 274
- HERZOG, G.  
1940 Genetische und cytologische untersuchungen über 15-chromosomigen  
mutanten von Oenothera biennis und O. lamarckiana.- Flora, 134: 377-432
- HOLH, G., BAJER, A.  
1966 Cine micrographic studies on mitotic spiralization cycle.- Hereditas  
(Lond.), 54: 356-375
- HU, C.H.  
1968 Studies on the development of twelve types of trisomics in rice with  
reference to genetic study and breeding program.- J. Agric. Assoc.  
China, 63: 53-71 (N.S.)
- HYDE, B.B.  
1953 Differentiated chromosomes in Plantago ovata.- Am. J. Botany, 40: 809-815
- ISHIMURA, S.  
1972 Cytological studies on polyploid sugarbeets with special reference to  
same problems associated with occurrence of aneuploids.- Hokkaido  
Takushoku Jr. Coll. Bull., Spec. Vol. 5
- ISHIMURA, S.  
1981 Sobre la serie de trisómicos primarios en Beta vulgaris L. (Comunicación  
personal)
- JACOB, K.M.  
1956 The pachytene chromosomes of the castor oil plant.- Cytologia, 21: 76-80
- JACOB, K.M.  
1963 A trisomic male castor bean plant.- J. Hered., 54: 292-296
- JAUHAR, P.P.  
1978 Primary trisomic in tall fescue.- J. Hered., 69: 217-223
- JELENKOVIC, G., HARRINGTON, E.  
1972 Morphology of the pachytene chromosomes in Prunus persica.- Can. J.  
Genet. Cytol., 14: 317-324
- JOHNSON, H.  
1942 Cytological studies of triploid progenies of Populus tremula.-  
Hereditas, 28: 306-312
- JONG, J.H. de  
1978 A Carmine-giemsa staining technic for meiotic prophase chromosomes of  
the genus Beta L.- Stain Technology, 53: 169-172
- JONG, J.H. de, BLOM, G.H.  
1981 The pachytene chromosomes of Beta procumbens.- CHR.SM. Instituut voor  
Rationele Suikerproductie. Mededeling Nr. 7

- JONG, G.H. de, BOCK, T.S.M. de  
1978 Use of haploids of Beta Vulgaris L. for the study of orcein and giemsa stained chromosomes.- Euphytica, 27: 41-47
- KAKHIDZE, N.  
1935 Karyological analysis of Beta vulgaris L.- Bull. Appl. Bot., Genet & Plant Breed. II (8): 99-104, 196-197
- KALTSIKES, P.J.  
1966 The production and identification of primary trisomics types of sugar beet (Beta vulgaris, L.)- M.S. Thesis. Univ. Manitoba, Manitoba, Canada
- KALTSIKES, P.J., EVANS, L.E.  
1967 Production and identification of trisomic types in Beta vulgaris - Can. J. Genet. Cytol., 9: 691-699
- KAMANOI, M., JENKINS, B.C.  
1962 Trisomics in common rye, Secale cereale.- Seiken Zihō., 13: 118-123
- KASHA, K.J., McLENNAN, H.A.  
1967 Trisomics in diploid alfalfa. I. Production, fertility and transmission.- Chromosoma, 21: 232-242
- KHUSH, G.S.  
1973 Cytogenetics of Aneuploids.- Academic Press, New York and London.
- KOHEL, R.J.  
1966 Identification of super cup mutant in cotton, Gossypium hirsutum L.- Crop. Sci., 6: 86-87
- KOLLER, P.C.  
1938 Asynapsis in Pisum sativum.- J. Genet., 36: 275-306
- KRUSE, A.  
1961 Haploids in polyembryos of beet Beta vulgaris L.- Roy. Vet. Agr. Coll. Copenhagen, Yearb. 1961: 87-98
- KRUSE, A.  
1963 Pure lines and their hybrids in beets Beta vulgaris L.- Ibid. 1963: 42-53
- KURATA, N., OMURA, T.  
1978 Karyotype analysis in rice. I. A new method for identifying all chromosome pairs.- Japan J. Genetics Vol. 53 (4): 251-255
- KURATA, N., OMURA, T., IWATA, N.  
1981 Studies on centromere, chromomere and nucleolus in pachytene nuclei of Rice, Oryza sativa, microsporocytes.- Cytologia, 46: 791-800
- LAM, S.L., ERIKSON, H.T.  
1968 Pachytene chromosomes of Solanum chacoense.- J. Heredity, 59: 369-373
- LAM, S.L., ERICKSON, H.T.  
1971 The nucleolar trisomic and trisomic transmission in a diploid potato.- J. Hered. 62: 375-376

- LASA, J.H., BOSEMARK, N.O.  
1973 Sobre bandas G en Beta vulgaris L. (Comunicación personal)
- LEE, H.K., HANNEHAN, R.E. jr  
1976 Identification of the extra chromosomes in giemsa stained somatic cells of pachytene identified trisomics of Solanum chacoense.- Can. J. Genet. Cytol., 18: 297-302
- LESINS, K., LESISNS, I., GILLIES, C.B.  
1970 Medicago murex with 2n=16 and 2n=14 chromosome complements.- Chromosoma, 30: 109-122
- LEVAN, A.  
1937 Chromosome numbers in Petunia.- Hereditas, 23: 99-112
- LEVAN, A.  
1942 The effect of chromosomal variation in sugar beets.- Hereditas, 28: 345-399
- LEVAN, A.  
1945 A haploid sugar beet after colchicine treatment.- Hereditas, 31: 399-410
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A.  
1964 Nomenclature for centromeric position on chromosomes.- Hereditas, 52: 201-20
- LEWIN, B.  
1980 Gene expression. 2. Eucaryotic chromosomes. (2ª edición).- John Wiley and Sons, London
- LEWITSKY, G.A.  
1927 Die Bildung bivalenter chromosomen in der gonogenese von Beta vulgaris L. Planta, 3: 100-114
- LIMA-DE-FARIA, A.  
1949 The structure of the centromere of the chromosomes of rye.- Hereditas, 35: 77-85
- LIMA-DE-FARIA, A.  
1952a Chromomere analysis of the chromosome complement of rye.- Chromosome, 5: 1-68
- LIMA-DE-FARIA, A.  
1952b The chromomere size gradient of the chromosomes of rye.- Hereditas, 38 (2): 246-248
- LIMA-DE-FARIA, A.  
1954 Chromosome gradient and chromosome field in Agapanthus.- Chromosoma, 6: 330-370
- LIMA-DE-FARIA, A., SARUELLA, P.  
1958 The organization of telomeres in species of Solanum, Salvia, Scilla, Secale, Agapanthus and Ornithogalum.- Hereditas, 44 (2-3): 337-346

- LIMA-DE-FARIA, A., SARVELLA, P., MORRIS, R.  
1959 Different chromomere numbers at meiosis and mitosis in Ornithogalum.- Hereditas, 45 (4): 467-480
- LIMA-DE-FARIA, A.  
1975 The relation between chromomeres, replicons, operons, transcription units, genes, viruses and palindromes.- Hereditas, 81: 249-284
- LIN, Y.J., CHEN, J.F.  
1981 Trisomics in diploid marigold, Tagetes erecta.- J. Hered., 72: 441-442
- LIN, P.S., ROSS, J.G.  
1969 Morphology and cytological behavior of aneuploids of Sorghum bicolor.- Can. J. Genet. Cytol., 11: 908-918
- LINDE-LAURSEN, I.  
1964 Studies in cytology and fertility of polyploid and aneuploid beet.- Yearbook, R. Vet. Agric. Coll. (Copenhagen) 1964: 93-120
- LUCIANI, J.H., MORAZZANI, H.R., STAHL, A.  
1975 Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique.- Chromosoma, 52: 275-282
- MADHUSOODANAN, K.J., PAL, M.  
1977 A primary trisomic in Amaranthus tricolor L.- New Bot., 3: 70-73
- MAGUIRE, M.P.  
1977 Variability in chromomere pattern in a specific chromosome region at pachytene.- Cytologia, 42: 57-63
- MATERN, B., SIMAK, H.  
1968 Statistical problems in Karyotype analysis.- Hereditas, 59: 280-288
- MCDONALD, M.C.  
1961 Barley pachytene chromosomes and the localization of the erectoides 7 translocation point on chromosome 5.- Can. J. Genet. Cytol., 3: 13-17
- McCLINTOCK, B.  
1929 A cytological study of triploid maize.- Genetics, 14: 180-222
- McCLINTOCK, B.  
1929 Chromosome morphology in Zea mays.- Science, 69: 629
- McFARLANE, J.S.  
1954 New non-bolting and mildew-resistant seed releases.- Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol., 8: 88-89
- MOCHIZUKI, A.  
1953 Genetic and cytological studies on the genus Beta. V. Production of triploid seeds.- In Improvement of Sugar Beets by Means of Triploidy (S. Matsumura, ed.), pp. 14-39, Kyoto Univ., Kyoto, Japan

NAGL, W.

- 1969 The course of the first meiotic prophase in Beta procumbens and in the F1 between Beta vulgaris and Beta procumbens.- Theor. Appl. Genet., 39: 356-360

NAKAMURA, C.

- 1979 Nematode resistance in diploid sugar beet.- Ph.D. Dissertation. Colorado State Univ., Fort Collins.

NAKAMURA, C., TSUCHIYA, T.

- 1976 Cytological behavior of alien addition trisomics in sugar beet.- Agron. Abstr.: 58

NAKAMURA, C., TSUCHIYA, T.

- 1979 Meiotic chromosome behavior of nematode-resistant trisomics in sugar-beet.- Theor. Appl. Genet. (Submitted)

NAKAMURA, C., TSUCHIYA, T.

- 1982 Pachytene chromosome morphology in diploid sugar beet, Beta vulgaris L.- Z. Pflanzenzüchtg., 89: 229-244

NODA, K., KASHA, K.J.

- 1976 Barley chromosome identification with the C-banding giemsa stain technique.- Crop Science Dept., University of Guelph, Guelph, Ontario Canada N1g2 2W1.

OHNUKI, Y.

- 1968 Structure of chromosomes. I. Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes.- Chromosoma, 25: 402-428

OHRI, D., NAZEER, M.A.

- 1979 A case of trisomy in Lathyrus odoratus L.- Curr. Sci., 48: 24

OKADA, T.A., COMINGS, D.E.

- 1974 Mechanisms of chromosome banding. III. Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of meiotic chromosomes.- Chromosoma, 48: 65-71

PALMER, R.G.

- 1976 Chromosome transmission and morphology of three primary trisomics in soybeans (Glycine max).- Can. J. Genet. Cytol., 18: 131-140

PARIA, P., BASAK, S.L.

- 1979 Cytology and breeding behaviour of trisomics in jute.- Ind. J. Genet. Plant Breed., 39: 471-479

PATIL, S.H.

- 1968 Cytogenetics of X-rays induced aneuploids in Arachis hypogaea L.- Can. J. Genet. Cytol., 10: 545-550

PATTERSON, R.M., PETRICCIANI, J.C.

- 1973 A comparison of prophase and metaphase G-bands in the Muntjak.- J. of Heredity, 64 (2): 80-82

POCHARD, E.

- 1968 Isolation of ten primary trisomics in the progeny of a haploid pepper plant (Capsicum annum.).- Proc. 12th Int. Congr. Genet., Tokyo, 1: 266

RAMANNA, M.S., WAGENVOORT, M.

- 1976 Identification of the trisomic series in diploid Solanum tuberosum L. Group tuberosum. I. Chromosome identification.- Euphytica, 25: 233-240

RAMULU, S.K., CUREUX, M., CARLUCCIO, F., METTANCOURT, D. de

- 1978 Trisomics from triploid-diploid crosses in self-incompatible Lycopersicum peruvianum.- Theoret. Appl. Genet., 51: 271-275

RAO, P.N.

- 1976 Chromosome elimination in trisomics of Coix aquatica.- Theoret. Appl. Genetic., 48: 179-184

RAO, P.N., STOKES, G.W.

- 1963 Cytogenetic analysis of the F1 of haploid x diploid tobacco.- Genetics, 48: 1423-1433

RATTENBURY, T.A.

- 1956 A rapid method for permanent acetocarmine squash preparations.- Nature, 117: 1185-1186

REDDY, J.

- 1981 Pachytene analyses in Cajanus cajan, Atylosia Lineata and their hybrid.- Cytologia, 46: 397-412

REES, H., JONES, R.N.

- 1977 Chromosome Genetics.- Edward Arnold (Publishers) limited. London W1X8LL.

RICK, C.M., BARTON, D.W.

- 1954 Cytological and genetical identification of the primary trisomics of the tomato.- Genetics, 39: 640-666

ROBBELEN, G.

- 1960 Beiträge zur analyse des Brassica-Genoms.- Chromosoma, 11: 205-228

ROMAGOSA, I.

- 1980 Meiosis in triploid sugarbeet.- M.S. Thesis, Colorado State Univ., Fort Collins.

ROMAGOSA, I.

- 1982 Primary trisomics in sugarbeet.- Ph.D. Dissertation. Colorado State Univ., Fort Collins.

RUDORF-LAURITZEN, M.

- 1958 The trisomics of Antirrhinum majus L.- Proc. 10th Int. Congr. Genet., Montreal, 2: 243-244

SARVELLA, P., HOLMGREN, J.B., NILAN, R.A.

- 1958 Analysis of barley pachytene chromosomes.- Nucleus I: 183-204

- SASAKI, M.  
1961 Observations on the modification in size and shape of chromosomes due to technical procedure.- *Chromosoma*, 11: 514-522
- SAVITSKY, H., CHAREVCKO-SAVICKAJA, E.J.  
1940 Citologija i embriologija sackarvoj svekly.- *Sveklovodstvo*, 1: 453-458
- SEARS, E.R.  
1939 Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. I. Chromosomal aberrations in the progeny of a haploid of *Triticum vulgare*.- *Genetics*, 24: 509-523
- SHAH, S.S.  
1964 Studies on a triploid, a tetrasomic triploid and a trisomic plant of *Dactylis glomerata*.- *Chromosoma*, 15: 469-477
- SINGH, A.  
1972 Trisomics in *Cyanopsis psoraloides*.- *Can. J. Genet. Cytol.*, 14: 200-204
- SINGH, R.J., LELLEY, T.  
1975 Giemsa banding in meiotic chromosomes of rye, *Secale cereale* L.- *Z. Pflanzenzüchtg.*, 75: 85-89
- SINGH, R.J., ROMAGOSA, I.  
1981 Sobre bandas G en *Beta vulgaris* L. (Comunicación personal)
- SINGH, D., SINGH, A.  
1978 Primary trisomics of *Trigonella corniculata*. I. Morphology and identification.- *Caryologia*, 31: 355-361
- SIROTINA, M.  
1936 Stravnitel'noe Kariologiceskoe izucenie roda *Beta vulgaris*.- *Navc. Zap. Vnis*, 2 (cited from Savitsky, 1940)
- SKARACIS, G.  
1980 Meiosis in diploid sugarbeet.- M.S. Thesis. Colorado State Univ., Fort Collins.
- SMITH, G.A.  
1980 Sugarbeet. In *Hybridization of crop plants* (W.R. Fehr and H.H. Hadley, eds.), pp. 601-616. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H.  
1981 Principles and procedures of statistics.- A Biometrical Approach, 2nd Ed. McGraw-Hill Book Company, New York.
- STEINITZ-SEARS, L.M.  
1963 Chromosome studies in *Arabidopsis thaliana*.- *Genetics*, 48: 483-490
- SUBRAHMANYAM, M.  
1977 A trisomic in *Sesamum indicum* L.- *Madras Agric. J.*, 64: 338-339
- SVARDSON, G.  
1945 Chromosome studies on *Salmonidae*.- *Med. fr. Stat. Unders. o. Försöksanst. f. Söt vatt*, 23: 1-151

- SYBENGA, J.  
1959 Some sources of error in the determination of chromosome length.-  
Chromosoma, 10: 355-364
- TABUSHI, J.  
1958 Trisomics of spinach.- Seiken Ziho, 9: 49-57
- TAKAHASHI, M., KINOSHITA, T., ANDO, S.  
1968 Studies in polyploid varieties of sugar beets. Chromosomal variation  
in progeny of crosses involving diploid, triploid and tetraploid plants.-  
J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 55 (4): 382-401
- TANAKA, R.  
1967 A comparative Karyotype analysis in Haplopappus gracilis (2n=14) and  
H. ravenii (2n=8).- Cytologia, 32: 542-552
- TJIO, J.H., LEVAN, A.  
1950 The use of oxyquinoline in chromosome analysis.- An. Aula Dei, 2 (1):  
21-64
- TJIO, J.H., LEVAN, A.  
1956 Note on the sex chromosome of the rat during male meiosis.-  
An. Aula Dei, 4 (3-4): 173-184
- TSUCHIYA, T.  
1959 Studies on trisomics in barley.- Ph.D. Dissertation. Kyoto Univ.,  
Kyoto, Japan
- TSUCHIYA, T.  
1967 Establishment of a trisomic series in a two-rowed cultivated variety of  
barley.- Can. J. Genet. Cytol., 9: 667-682
- TSUCHIYA, T., NAKAMURA, C.  
1979 Acetocarmine squash method for observing sugar beet chromosomes.-  
Euphytica, 28: 249-256
- VASEK, F.C.  
1956 Induced aneuploidy in Clarkia unguiculata (Onagraceae).- Am. J. Bot.,  
43: 366-371
- WAGENVOORT, H., RAMANA, M.S.  
1979 Identification of the trisomic series in diploid Solanum tuberosum L.  
group tuberosum. II. Trivalent configurations at pachytene stage.-  
Euphytica, 28: 633-642
- WALIA, K.  
1971 Meiotic prophase in the genus Beta (Beta vulgaris 2x and 4x, Beta  
webbiana and Beta patellaris).- Z. Pflanzenzuchtg., 65: 141-150
- WHELAN, E.D.P.  
1969 Pachytene morphology of Prunus avium L. cv. Lambert.- Can. J. Genet.  
Cytol., 11: 125-132
- WICKBOM, T.  
1949 The time factor of chromosome spiralization.- Hereditas, 35: 245-248



- WILSON, E.B.  
1925 The cell in development and heredity. (3rd edition).- McMillan, New York, 1232 pp.
- YARNELL, S.H.  
1931 A study of certain polyploid and aneuploid forms in Fragaria.- Genetics, 16: 455-489
- YONEZAWA, Y.  
1981 Cytological and cytogenetic studies on the transposition of centromere and the Karyotype differentiation in Haplopappus gracilis. I. A new-shaped chromosome.- Cytologia, 46: 431-441
- YU, M.H.  
1977 Preliminary study of pachytene morphology in a homozygous line of sugar beet.- Crop. Sci., 17: 833-836
- YU, M.  
1980 Meiotic chromosome behavior in monoploid sugarbeet.- Can. J. Genet. Cytol., 22: 375-380
- YU, R.L., ARONSON, H.M., NICHOLS, W.W.  
1981 High-resolution bands in human fibroblast chromosomes induced by actinomycin D.- Cytogenet. Cell. Genet., 31 (2): 111-114
- YÜCE, S.  
1973 Haploide bei der Zuckerrube Inaugural-Dissert. Univers. Giebsen.
- YUNIS, J., SAWYER, J.R., DUNHAN, K.  
1980 The striking resemblance of high-resolution G-banded chromosomes of man and chimpanzee.- Science, 208 (4448): 1145-1148
- ZAIKOVSKAIA, N.  
1938 Stravnitel'noe izuvenie morfolojii chromosom Kul'turnych form vida Beta vulgaris L.- Nauc. Zap. Vnis, 5 (cited from Savitsky, 1940)
- ZIMMERMANN, K.  
1953 Verwendung haploider pflanzen in der Züchtung.- Ber. Deut. Bot. Ges., 66: 28-30

